

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO MOISÉS DE MATOS

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS FATORES DE INICIAÇÃO DA
TRADUÇÃO EIF4E DE *Trypanosoma cruzi* E ANÁLISE DE INTERAÇÕES COM A
TcEIF4G5 E ANÁLOGOS DO CAP DO mRNA

CURITIBA - PR

2018

BRUNO MOISÉS DE MATOS

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS FATORES DE INICIAÇÃO DA
TRADUÇÃO EIF4E DE *Trypanosoma cruzi* E ANÁLISE DE INTERAÇÕES COM A
TcEIF4G5 E ANÁLOGOS DO *cap* DO mRNA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica),
no Curso de Pós-Graduação em Ciências
(Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Beatriz Gomes Guimarães

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Matos, Bruno Moisés de

Caracterização estrutural dos fatores de iniciação da tradução EIF4E de *Trypanosoma cruzi* e análise de interações com a TcEIF4G5 e análogos do CAP do mRNA. / Bruno Moisés de Matos. – Curitiba, 2018.

79 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Beatriz Gomes Guimaraes

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. *Trypanosoma cruzi* . 2. Aspectos moleculares . 3. Chagas, Doença de.
I. Título II. Guimaraes, Beatriz Gomes. III. Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 616.9363



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

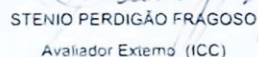
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **BRUNO MOISES DE MATOS** intitulada: **Caracterização estrutural dos fatores de iniciação da tradução EIF4E de *Trypanosoma cruzi* e análise de interações com a TcEIF4G5 e análogos do CAP do mRNA**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 22 de Março de 2018.


BEATRIZ GOMES GUIMARAES
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


LUCIANO FERNANDES HUERGO
Avaliador Interno (UFPR)


STENIO PERDIGÃO FRAGOSO
Avaliador Externo (ICC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família pelo apoio e amor incondicionais. Estar longe às vezes não é fácil, o tempo é curto para tudo, mas ainda assim sempre vamos estar lá uns para os outros, e é o que importa para mim. Muito obrigado por tudo!

Agradeço também aos meus amigos e colegas do Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas que todos os dias puderam conviver comigo de forma positiva, não importando a circunstância. Vocês fazem parte da minha história como alicerces, sem os quais não teria chegado até aqui.

Agradeço à minha orientadora Beatriz Gomes Guimarães pelo apoio, aprendizado, paciência e convívio sempre agradável e profissionalmente valoroso, e aos professores e orientadores Nilson I. T. Zanchin, Tatiana A. C. Brasil de Souza e Flávia R. G. Carneiro, do Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas, pelo apoio e colaboração sempre solícita e pertinente, estendendo meu agradecimento a todos os demais colaboradores do projeto no ICC/Fiocruz-PR.

Agradeço ao Programa de pós-graduação em Ciências (Bioquímica) e à Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de realização do curso e obtenção de grau de Mestre.

“Não é na ciência que está a felicidade,
mas na aquisição da ciência”.
(Edgar Allan Poe)

RESUMO

A Doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, mesmo mais de um século depois de sua descrição ainda é um problema atual de saúde pública. Não há vacina contra a doença e acredita-se que o tratamento existente seja realmente eficiente apenas para a fase aguda, tendo sido relacionado com graves efeitos colaterais. Buscando assim maior seletividade, o desenvolvimento de novos compostos visando terapias para a Doença de Chagas tem focado na identificação de mecanismos moleculares únicos no parasita em relação ao seu hospedeiro mamífero. Dentre as características singulares a tripanossomatídeos destacam-se algumas relacionadas à maquinaria de tradução, como a estrutura diferenciada de *cap* do mRNA, o *cap4*, e a presença de um grande número de homólogas de fatores de iniciação da tradução, dentre eles a proteína ligadora de *cap* eIF4E. As interações entre os fatores de iniciação de tradução dos tripanossomatídeos também apresentam especificidades, como, por exemplo, a interação realizada por diferentes EIF4E com os fatores EIF4G para a formação de complexos EIF4F-like. Neste contexto, o projeto teve como objetivo a análise de interações realizadas pelos fatores EIF4E de *T. cruzi* (TcEIF4E) com análogos do *cap* do mRNA e entre os fatores TcEIF4E5 e TcEIF4G5, e assim a caracterização de uma interação espécie-específica. As homólogas TcEIF4E1 e 5 foram produzidas em *Escherichia coli* e purificadas por cromatografia. Formas truncadas recombinantes da TcEIF4G5 foram também produzidas, purificadas e submetidas a ensaios de interação com a TcEIF4E5. A interação direta entre TcEIF4E5-TcEIF4G5 foi demonstrada através da técnica de termoforese em microescala, determinando-se que a interação envolve a região N-terminal da TcEIF4G5. Visando a determinação da estrutura cristalográfica o homólogo TcEIF4E5 foi cristalizado em presença de análogos *cap*. O domínio MIF da TcEIF4G5 também foi cristalizado. Análises de modelagem estrutural das homólogas TcEIF4E indicam a presença de modificações importantes em regiões chave para a interação entre tais proteínas e a estrutura do *cap* do mRNA, sugerindo que as TcEIF4E possuem funcionalidades distintas no maquinário de iniciação de tradução.

Palavras-chave: Tripanossomatídeos. Fatores de iniciação da tradução. Interações moleculares. Análises estruturais.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, remains a public health problem, over a century since the disease discovery. There is no approved vaccine and the existing treatment is thought to be effective only for the acute phase besides being associated to severe side effects. In the search for higher selectivity, the development of novel compounds aiming Chagas disease therapy have focused on molecular mechanisms that are unique to the parasite. Among the features specific to trypanosomatids that stand out, some belong to the translational machinery, such as the mRNA cap-4 structure, a larger number of genes encoding translation initiation factors, including the putative cap-binding proteins (EIF4E). Some interactions between trypanosomatids translation initiation factors are also specific as for example interactions between different EIF4E and EIF4G homologs. In this context, this project was started with the objective to investigate the interactions between *T. cruzi* IF4E (TcEIF4E) homologs with mRNA-cap analogs and between the translation factors TcIF4E5 and TcEIF4G5. The translation factors TcEIF4E1 and TcEIF4E5 homologs were expressed in *Escherichia coli* and purified by chromatography. Truncated derivatives of TcIF4G5 were also obtained after recombinant expression in *E. coli* and used in interaction assays with recombinant TcEIF4E5. Direct interaction between TcEIF4E5 e TcEIF4G5 was determined using microscale thermophoresis. This interaction was mapped to the N-terminal region of TcEIF4G5. TcEIF4E5 was successfully crystallized in the presence of cap analogs. Crystallization was also performed with the MIF domain of TcEIF4G5. Analysis of structural models constructed by homology indicate that TcEIF4E isoforms possess important modifications in the regions that interact with the mRNA cap structure, suggesting that they can play distinct roles in translation initiation.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*. Translation initiation factors. Molecular interactions. Structural analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do processo de iniciação da tradução em eucariotos.....	25
Figura 2 - Representação do <i>cap4</i> presente em tripanossomatídeos.....	27
Figura 3 - Representação da estrutura de eIF4E1 humana em complexo com o análogo de <i>cap</i> m ⁷ GTP e o peptídeo de IF4G humana.	31
Figura 4 - Esquema das construções truncadas da TcEIF4G5 em comparação à sequência completa.	43
Figura 5 - Resultado da purificação da TcEIF4E1 por cromatografia de afinidade (coluna HisTrap HP 5 mL).	45
Figura 6 - Resultado da purificação da TcEIF4E1 por cromatografia de troca iônica (coluna HiTrap Q-Sepharose 5 mL).	46
Figura 7 - Resultado da purificação da TcEIF4E1 por cromatografia de exclusão por tamanho (coluna Superdex 75 16/600).	46
Figura 8 - Resultado da purificação da TcEIF4E5 por cromatografia de afinidade (coluna HisTrap HP 5 mL).	47
Figura 9 - Resultado da purificação da TcEIF4E5 por cromatografia de troca iônica (coluna HiTrap SP-Sepharose 5 mL).	48
Figura 10 - Resultado da purificação da TcEIF4E5 por cromatografia de exclusão por tamanho (coluna Superdex 75 16/600).	48
Figura 11 - Cromatografias de exclusão por tamanho da TcEIF4E5 para análise das populações dimérica (pico 1) e monomérica (pico 2).	49
Figura 12 - Análise por SDS-PAGE 13% dos testes de expressão das construções truncadas da TcEIF4G5.	50
Figura 13 - Resultado da purificação da TcEIF4G5_MIF por cromatografia de afinidade (coluna HisTrap HP 5 mL).	51
Figura 14 - Resultado da purificação da TcEIF4G5_MIF por cromatografia de exclusão por tamanho (coluna Superdex 75 16/600).	51
Figura 15 - Resultado da purificação da TcEIF4G5_ΔC por cromatografia de afinidade (coluna HisTrap HP 1 mL).	52
Figura 16 - Resultado da purificação da TcEIF4G5_ΔC por cromatografia de exclusão por tamanho na coluna Superdex 75 10/300.	53

Figura 17 - Teste de reação dos soros imunizados contra as proteínas recombinantes TcEIF4E1, TcEIF4E5 E TcEIF4G5_ΔC.	54
Figura 18 - Espectro de dicroísmo circular obtido das proteínas TcEIF4E1, TcEIF4E2 E TcEIF4E5.	55
Figura 19 – Resultados do experimento de desnaturação térmica para as proteínas TcEIF4E1, TcEIF4E2 e TcEIF4E5.	56
Figura 20 - Padrões de eluição das proteínas TcEIF4E5, TcEIF4G5_MIF e TcEIF4G5_ΔC na coluna Superdex 75 10/300.	57
Figura 21 – Análise de interação entre as proteínas TcEIF4E5 e TcEIF4G5_MIF por cromatografia de exclusão por tamanho.	58
Figura 22 – Análise de interação entre as proteínas TcEIF4E5 e TcEIF4G5_ΔC por cromatografia de exclusão por tamanho.	59
Figura 23 – Análise de interação entre TcEIF4E5 e TcEIF4G5 por termoforese em microescala.	60
Figura 24 – Análise de interação entre a TcEIF4E1 e os análogos do <i>cap</i> do mRNA m ⁷ GTP e m ⁷ GTP-A por termoforese em microescala.	62
Figura 25 - Curvas de fluorescência bruta obtidas no experimento de termoforese em microescala entre TcEIF4E5 e o m ⁷ GTP (A) e entre TcEIF4E1 e o m ⁷ GTP (B).	63
Figura 26 – Curvas de fluorescência bruta obtidas no experimento de termoforese em microescala entre TcEIF4E5 e o m ⁷ GTP (A) e m ⁷ GTP-A (B).	63
Figura 27 - Cristais de TcEIF4E5 obtidos após incubação com análogo do <i>cap</i> m ⁷ GTP (A) e m ⁷ GTP-A (B).	65
Figura 28 – Cristais de TcEIF4G5_MIF.	65
Figura 29 - Alinhamento baseado nas estruturas das homólogas TcEIF4E e a homóloga humana.	67
Figura 30 - Sobreposição estrutural entre os modelos TcEIF4E1 e 2 e a eIF4E1 humana.	68
Figura 31 - Sobreposição estrutural entre os modelos TcEIF4E3 e 4 e a eIF4E1 humana.	69
Figura 32 - Sobreposição estrutural entre os modelos TcEIF4E5 e 6 e a eIF4E1 humana.	70
Figura 33 – Análise estrutural da região de interação com o <i>cap</i> do mRNA da eIF4E1 humana e das homólogas TcEIF4E	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Interações já caracterizadas entre fatores de iniciação de tradução de tripanossomatídeos.	28
Tabela 2 – Alvos de interesse nos testes de expressão.	33
Tabela 3 - Resultados dos testes de expressão das proteínas.	44
Tabela 4 – Índices de similaridade obtidos pelos alinhamentos estruturais entre os modelos das TcEIF4E e a estrutura cristalográfica da eIF4E1 humana.	66
Tabela 5 - Comparação dos resíduos envolvidos em interações com o <i>cap</i> na homóloga humana e nas homólogas TcEIF4E, através de alinhamento estrutural pela ferramenta TM-align.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD: discoísmo circular, do inglês *circular dichroism*

DO₆₀₀: densidade ótica medida a 600 nm

DTT: 1,4-Ditiotreitol

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

eIF: fator de iniciação da tradução, originalmente do inglês *eukaryotic initiation factor*

FPLC: cromatografia líquida rápida de proteínas, do inglês *fast protein liquid chromatography*

GST: glutationa S-transferase

GTP: guanosina trifosfato

IPTG: Isopropil-β-tiogalactopiranosídeo

K_d: constante de dissociação

m⁷GTP: 7-metil-guanosina-5'-trifosfato

m⁷GTP-A: 7-metil-guanosina-5'-trifosfato-adenosina

PVDF: Fluoreto de polivinilideno

PDB: *Protein Data Bank*

PEG: polietilenoglicol

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida (do inglês *polyacrylamide gel electrophoresis*) em presença de detergente SDS.

VC: volume de coluna

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	JUSTIFICATIVA.....	15
1.2	OBJETIVOS	16
1.2.1	Objetivos Específicos	16
1.3	METODOLOGIA.....	17
1.3.1	Expressão e purificação das proteínas	17
1.3.2	Purificação de proteínas.....	17
1.3.3	Caracterização estrutural	18
1.3.3.1	<i>Dicroísmo Circular</i>	18
1.3.3.2	<i>Cristalização</i>	18
1.3.3.3	<i>Modelagem estrutural</i>	19
1.3.4	Ensaio de interação <i>in vitro</i>	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	<i>Trypanosoma cruzi</i> E DOENÇA DE CHAGAS	21
2.2	MECANISMO DE TRADUÇÃO EM EUCARIOTOS.....	22
2.3	MAQUINARIA DE TRADUÇÃO EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	26
2.4	OS FATORES DE INICIAÇÃO DE TRADUÇÃO EIF4E	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	TESTE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS E CONSTRUÇÕES	33
3.2	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA TcEIF4E1	34
3.3	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA TcEIF4E5	35
3.4	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DA TcEIF4G5	36
3.4.1	Purificação da TcEIF4G5_ΔC.....	36
3.4.2	Purificação da TcEIF4G5_MIF	37
3.5	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS.....	37
3.6	EXPERIMENTOS DE DICROÍSMO CIRCULAR	38
3.7	ENSAIO DE INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcEIF4E5 E TcEIF4G5-ΔC POR CROMATOGRAPHIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO	39
3.8	ENSAIOS DE INTERAÇÃO ENTRE TcEIF4E1 E 4E5 COM ANÁLOGOS DO CAP E TcEIF4E5-TcEIF4G5 POR TERMOFORESE EM MICROESCALA.....	39
3.9	ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO E COLETA DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	41

3.10	MODELAGEM POR HOMOLOGIA E COMPARAÇÕES ESTRUTURAIS....	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	DESENHO DAS CONSTRUÇÕES DA TcEIF4G5.....	43
4.2	TESTES DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	44
4.3	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA TcEIF4E1	45
4.4	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA TcEIF4E5	46
4.5	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DA TcEIF4G5	49
4.5.1	Purificação da TcEIF4G5_MIF	50
4.5.2	Purificação da TcEIF4G5_ΔC.....	51
4.6	TESTE DOS SOROS DOS CAMUNDONGOS INOCULADOS COM AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	54
4.7	ANÁLISE DAS PROTEÍNAS TcEIF4E POR DICROÍSMO CIRCULAR	54
4.8	ANÁLISE DE INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcEIF4E5 E TcEIF4G5 POR CROMATOGRAPHIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO.....	57
4.9	ANÁLISE DA INTERAÇÃO TcEIF4E5-TcEIF4G5 POR TERMOFORESE EM MICROESCALA	59
4.10	ANÁLISE DE INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcEIF4E E OS ANÁLOGOS DO CAP M ⁷ GTP E M ⁷ GTP-A POR TERMOFORESE EM MICROESCALA.....	61
4.10.1	TcEIF4E1 e análogos <i>cap</i>	61
4.10.2	TcEIF4E5 e análogos <i>cap</i>	62
4.11	CRISTALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcEIF4E5 E CONSTRUÇÃO TcEIF4G5_MIF	64
4.12	ANÁLISE DOS MODELOS ESTRUTURAIS DAS HOMÓLOGAS TcEIF4E	66
4.12.1	Análise de inserções.....	66
4.12.2	Análise do sítio de interação com o <i>cap</i> do mRNA.....	70
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
5.1	PERSPECTIVAS	74
	REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi*, causador da Doença de Chagas, é um parasita encontrado na maior parte da América Latina, onde a doença é endêmica e negligenciada. O tratamento da doença continua ineficaz em muitos aspectos, especialmente considerando a progressão da doença à fase crônica e os efeitos adversos causados pelos medicamentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). Além disso, o controle epidemiológico da doença enfrenta também desafios frente à problemas sanitários e populações de vetores resistentes à inseticidas. Nesse contexto, o desenvolvimento de novas terapias para a Doença de Chagas, preferencialmente baseadas em uma alta seletividade, é visto como uma possível solução.

A síntese proteica é um processo essencial e altamente regulado em eucariotos, sendo a maquinaria de tradução formada por um grande número de fatores proteicos, com destaque aos que compõem complexos multiproteicos presentes na etapa de iniciação da tradução. Durante o processo, interações entre os fatores de iniciação da tradução (eIFs) são essenciais para a formação dos sub-complexos, permitindo que o mRNA e o ribossomo sejam unidos e a síntese proteica tenha início. Uma das proteínas chave da maquinaria de tradução é a proteína de ligação ao *cap* do mRNA, a eIF4E. Além de interagir com o mRNA permitindo que o mesmo seja carregado ao ribossomo, a eIF4E interage ainda com a eIF4G, a proteína que ancora o complexo eIF4F, responsável pelo transporte do mRNA (COSTELLO et al., 2015).

A eIF4E faz parte de uma família de proteínas que possui domínio estrutural bastante conservado. A interação entre essa proteína e o *cap* do mRNA é mediada por resíduos conservados presentes na cavidade de interação característica da estrutura. A principal interação se dá com a base nitrogenada do *cap* do mRNA, em que resíduos aromáticos atuam juntamente a um resíduo ácido altamente conservado, gerando uma interação do tipo *sandwich stacking*. Resíduos básicos presentes no arcabouço interagem com os grupos fosfato presentes, auxiliando na estabilização da interação (JOSHI; CAMERON; JAGUS, 2004). Apesar da ampla conservação do domínio dentre os membros da família eIF4E, subfamílias já foram caracterizadas apresentando diferenças nas interações realizadas com o *cap* e a eIF4G, sendo suas funções e mecanismos ainda pouco esclarecidos.

Tripanossomatídeos apresentam características específicas em seu maquinário de tradução quando comparados a outros eucariotos. A estrutura do mRNA maduro apresenta um *cap* diferenciado (*cap4*), que possui metilações adicionais nos quatro primeiros nucleotídeos do *spliced leader*. Outra característica notável nos tripanossomatídeos é a presença de diversas homólogas de eIFs, incluindo as proteínas EIF4E e EIF4G, os quais realizam interações específicas entre si, formando diferentes complexos *eIF4F-like* não encontrados em outros eucariotos. As homólogas EIF4E apresentam também afinidades diferentes pelo *cap4* do mRNA, associadas a diferenças em suas sequências (FREIRE et al., 2017). Nesse sentido, diferenças nas proteínas TcEIF4E em relação às homólogas indicam que elas interagem de maneira distinta no maquinário de iniciação de tradução de tripanossomatídeos, atreladas à presença do *cap4*.

1.1 JUSTIFICATIVA

No âmbito dos tripanossomatídeos, alguns estudos exploraram fatores de iniciação de tradução, sendo ampla maioria estudos realizados em *Trypanosoma brucei* ou espécies do gênero *Leishmania*. Com relação à *T. cruzi* o conhecimento acerca da funcionalidade e especificidades dos fatores de iniciação de tradução por parceiros na maquinaria de tradução ainda é escasso. A produção recombinante de proteínas permite análises *in vitro* complementares a análises funcionais *in vivo*. Assim, a obtenção das proteínas recombinantes com alta pureza, através de métodos cromatográficos, abre possibilidade a estudos de interação proteína-proteína e proteína-ligante, além de ensaios de cristalização e para determinação de estruturas cristalográficas, que contribuem com informações mais detalhadas sobre interações e complexos formados. Em casos em que a obtenção de estrutura cristalográfica não seja possível, a modelagem estrutural apresenta-se como alternativa para complementar as análises.

A identificação de interações exclusivas em *T. cruzi* que envolvam os fatores de iniciação de tradução representa uma possibilidade de desenho de peptídeos sintéticos que ajam como inibidores seletivos para tais interações, portanto uma opção disponível para o desenvolvimento de terapias mais eficazes para a Doença de Chagas.

1.2 OBJETIVOS

O presente projeto faz parte de um projeto mais amplo cujo objetivo é o desenho de inibidores para a maquinaria de tradução de *T. cruzi*, como ponto de partida para o desenvolvimento de novas terapias para a Doença de Chagas. O objetivo geral do projeto de mestrado foi a obtenção das proteínas TcEIF4E e TcEIF4G de *T. cruzi* em sistema de expressão procarioto, e análise das proteínas purificadas através de métodos biofísicos, além de análises estruturais, visando a identificação de interações específicas envolvidas no contexto de complexos eIF4F-like.

1.2.1 Objetivos Específicos

- a) Expressão em *E. coli* e purificação das homólogas TcEIF4E e construções da TcEIF4G5.
- b) Obtenção de soro imunizado contra as proteínas recombinantes a partir da inoculação de camundongos.
- c) Caracterização das proteínas purificadas por dicroísmo circular.
- d) Ensaio de cristalização das proteínas purificadas na presença ou não de ligantes análogos do *cap*.
- e) Ensaio de interação entre as proteínas TcEIF4E5 e TcEIF4G5 através de cromatografia de exclusão por tamanho e termoforese em microescala.
- f) Ensaio de interação entre as TcEIF4E e análogos *cap* do mRNA através de termoforese em microescala.
- g) Obtenção de modelos estruturais das homólogas TcEIF4E e comparação com a homóloga humana.

1.3 METODOLOGIA

1.3.1 Expressão e purificação das proteínas

A estratégia experimental baseou-se na obtenção das proteínas de interesse através da expressão heteróloga em *Escherichia coli*, em cepas contendo uma construção lisogênica do fago lambda denominada de DE3, a qual possui o gene da RNA polimerase do fago T7 sob controle do promotor *lacUV5* sendo a expressão dessa polimerase induzida através de IPTG. Nos vetores de expressão, os genes das proteínas de interesse estão clonados sob o controle do promotor da RNA polimerase do fago T7, a qual sendo superexpressa leva a altos níveis de expressão das proteínas alvo (STUDIER; MOFFATT, 1986). Os genes foram clonados nos vetores pDEST17 (Thermo Fisher Scientific) e pET28a (Novagen) para expressão das proteínas em fusão com hexahistidinas, facilitando o processo de purificação. Os extratos bacterianos foram então processados através de lise de alta pressão e submetidos a métodos cromatográficos para obtenção de amostras puras de proteína.

1.3.2 Purificação de proteínas

Para a purificação das proteínas produzidas, foram utilizados 3 passos de cromatografia em sequência. A cromatografia de afinidade consiste na interação entre fusões específicas presentes na proteína recombinante e uma matriz contendo um ligante específico para tais moléculas, neste caso sendo utilizada a interação entre a fusão à hexahistidinas presente nas proteínas e uma resina contendo níquel imobilizado. A dissociação da proteína das colunas de afinidade se dá pela utilização de um competidor para essas interações, neste caso o imidazol, que passa a interagir prioritariamente com a matriz com o aumento de sua concentração e assim a proteína ligada é eluída (BLOCK et al., 2009). A cromatografia de troca iônica baseia-se na interação eletrostática entre a proteína em questão e uma matriz carregada negativamente (troca catiônica) ou positivamente (troca aniônica), sendo a análise do ponto isoelétrico da proteína e utilização de pH favorável à presença de cargas negativas ou positivas na mesma de vital importância para o sucesso do procedimento (SELKIRK, 2004). A cromatografia de exclusão de tamanho por sua

vez consiste na aplicação de uma amostra heterogênea em uma matriz sólida contendo poros que permitam a passagem seletiva das proteínas e peptídeos por tamanho, sendo as frações proteicas separadas a partir de sua velocidade de migração através na matriz (HONG; KOZA; BOUVIER, 2012).

1.3.3 Caracterização estrutural

A técnica de dicroísmo circular foi utilizada para a caracterização do enovelamento e estabilidade das proteínas purificadas. Estas foram também submetidas à cristalização visando a determinação de suas estruturas cristalográficas. Ainda, foram gerados modelos tridimensionais para as 6 homólogas TcEIF4E a partir de estruturas de proteínas homólogas disponíveis em bancos de dados.

1.3.3.1 *Dicroísmo Circular*

A técnica de Dicroísmo Circular consiste na utilização de luz circularmente polarizada, formada por duas componentes de mesma intensidade polarizadas à esquerda e à direita. A luz é incidida sobre uma amostra gerando uma diferença na absorção entre as componentes polarizadas em função do comprimento de onda. O método assim permite a caracterização do conteúdo de estrutura secundária da amostra, ou seja, α -hélices, folhas- β e *loops* presentes na amostra analisada (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

1.3.3.2 *Cristalização*

As proteínas purificadas foram submetidas a ensaios de cristalização por difusão de vapor, inicialmente através da utilização de *kits* comerciais contendo uma matriz de soluções tampão em variados pH, contendo diferentes sais e precipitantes em diferentes concentrações. A difusão de vapor consiste na submissão a um sistema fechado de gotas em escala sub-microlitro contendo diferentes proporções de proteína e a solução tampão, em interface com um volume proporcionalmente muito maior da mesma solução tampão (reservatório). Pelo isolamento do sistema, há tendência de reestabelecimento da concentração inicial da solução tampão

diluída juntamente à proteína na gota, assim havendo perda de água pela gota e consequente concentração da molécula proteica, que passa a precipitar-se (LI et al., 2008). A partir dos primeiros resultados e refinamento das condições de precipitação cristalina para cada proteína de interesse, condições ideais de obtenção de cristais foram determinadas. Os cristais obtidos foram criopreservados e posteriormente submetidos à difração de raios-X.

1.3.3.3 Modelagem estrutural

A modelagem estrutural das proteínas EIF4E de *T. cruzi* foi utilizada devido ao fato de o domínio eIF4E ser altamente conservado e estruturado, havendo estruturas de diversas homólogas eIF4E de outros organismos já resolvidas e disponíveis no PDB. Além disso, ainda não foram obtidas estruturas tridimensionais de homólogas EIF4E de tripanossomatídeos, reforçando a utilidade da modelagem. A plataforma *online* I-TASSER foi utilizada para a obtenção de modelos tridimensionais para todas as homólogas TcEIF4E. O algoritmo utilizado pelo programa I-TASSER é capaz de identificar e classificar fragmentos de estruturas depositadas no PDB, e a partir delas realizar a montagem do modelo estrutural de acordo com fragmentos contínuos selecionados no alinhamento, realizando modelagem *ab initio* para demais regiões não alinhadas (YANG, 2015). Além disso, o I-TASSER atribui a cada modelo um valor de *c-score*, o qual representa a confiabilidade do modelo gerado de acordo com a significância dos modelos utilizados e a convergência dos parâmetros utilizados para simulação de estrutura. Os modelos gerados foram sobrepostos com estruturas de proteínas homólogas disponíveis no Protein Data Bank (BERMAN et al., 2000), utilizando-se a ferramenta TM-align (ZHANG; SKOLNICK, 2005) para tal. Outra ferramenta utilizada foi o PROMALS3D (PEI; KIM; GRISHIN, 2008), a qual utiliza dados de estruturas homólogas e predição de estrutura secundária para gerar múltiplos alinhamentos de sequência, nesse caso utilizados para a comparação global entre as homólogas TcEIF4E.

1.3.4 Ensaios de interação *in vitro*

A análise de interação entre as proteínas TcEIF4E5 e as construções da TcEIF4G5 purificadas foi inicialmente realizada através de cromatografia de exclusão por tamanho, na qual as proteínas foram aplicadas à corrida cromatográfica de forma individual como controle e em conjunto, gerando padrões de eluição comparativos e visando a observação da interação direta entre as proteínas pelo aparecimento de picos de eluição correspondentes ao complexo formado.

A técnica de termoforese em microescala foi utilizada para a análise quantitativa da interação entre as proteínas TcEIF4E5 e TcEIF4G5, e também entre as proteínas TcEIF4E1 e TcEIF4E5 e análogos ao *cap*, visando a determinação de constantes de dissociação (K_d). O princípio da técnica consiste no movimento direcional das moléculas quando submetidas a um gradiente de temperatura. Esse movimento é dependente de características como superfície, carga e camada de solvatação das moléculas, que são alteradas pela presença de um ligante. Para a análise de uma interação através dessa técnica, uma das moléculas é marcada com um fluoróforo e a segunda é titulada. As amostras são misturadas e então submetidas ao gradiente de temperatura em um capilar (microescala), e o fenômeno de termoforese é detectado pelo equipamento através da medida da variação de fluorescência em volume definido em função do tempo. Assim, o experimento baseia-se na mudança de motilidade termoforética de uma molécula na presença de seu ligante titulado, permitindo então o cálculo da constante de dissociação (JERABEK-WILLEMSEM, 2014).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Trypanosoma cruzi* E DOENÇA DE CHAGAS

Tripanossomatídeos são eucariotos unicelulares pertencentes à classe Kinetoplastidae, caracterizada pela presença de uma estrutura diferenciada de alta densidade de DNA mitocondrial, o cinetoplasto (LOPES et al., 2010). Dentre os membros da família Trypanossomatidae, destacam-se os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, os quais contêm espécies causadoras de doenças que são parte da lista de doenças negligenciadas segundo a Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). O *Trypanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana, é um parasita obrigatório que tem sua presença amplamente distribuída na América Latina e cuja transmissão se dá através de insetos denominados triatomíneos, a exemplo das espécies *Triatoma infestans* e *Triatoma brasiliensis* (CDC, 2016), que ao realizarem repasto sanguíneo eliminam o parasita de seu organismo através de fezes e urina, permitindo sua entrada na corrente sanguínea através de rupturas na epiderme, dando início ao ciclo de alternância entre os hospedeiros vertebrado e invertebrado (TYLER; ENGMAN, 2001). Outras formas de transmissão se dão por transfusão de sangue infectado, transplante de órgãos, transmissão congênita e consumo de alimentos contaminados, sendo a última uma via de transmissão crescente nos últimos 10 anos na América Latina e no Brasil, representando hoje 68% dos casos de transmissão na região amazônica (COURA, 2006; CLAYTON, 2010; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2015;).

Devido à ausência de vacina, a eliminação do vetor de transmissão é vista como a forma de controle epidemiológico mais eficiente, porém mostra-se pouco efetiva frente aos problemas habitacionais e sanitários que permitem a multiplicação e dispersão dos insetos em países endêmicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012), e também pelo aparecimento de populações de vetores resistentes aos inseticidas usualmente utilizados em espécies como *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus* (FORLANI et al., 2015). O tratamento atual, em que são utilizadas as drogas Benznidazol (LAFEPE) e Nifurtimox (Bayer) tem aplicação eficaz apenas nos estágios iniciais da doença além de produzir graves efeitos colaterais (JANNIN;

VILLA, 2007). Em vista disso, há necessidade de desenvolvimento de novas terapias, em particular baseadas em compostos de ação mais específica.

O ciclo de vida do parasita se dá pela alternância entre os hospedeiros vertebrado e invertebrado. Durante sua o repasto sanguíneo, o vetor elimina através de seu sistema digestório parasitas flagelados altamente infectivos na forma de tripomastigotas, as quais acessam a corrente sanguínea. As tripomastigotas invadem células próximas e diferenciam-se em formas amastigotas, caracterizadas como formas proliferativas. As formas amastigotas irão diferenciar-se novamente em formas tripomastigotas que romperão o meio intracelular quando da saturação do citoplasma, e invadirão novas células gerando novos sítios de infecção. O vetor invertebrado, através da ingestão do sangue dos hospedeiros infectados irá ingerir formas tripomastigotas circulantes, as quais irão diferenciar-se em epimastigotas. Ao atingir as porções finais do intestino do vetor, as epimastigotas diferenciam-se a tripomastigotas, sendo eliminadas durante o processo de excreção do inseto (TYLER & ENGMAN, 2001). As diferentes condições às quais o parasita é exposto durante seu ciclo de vida, como diferentes temperaturas e pH, requerem alterações e regulação precisa dos padrões de expressão gênica. Tal regulação é feita quase exclusivamente através de mecanismos pós-transcricionais, visto que a classe dos cinetoplastídeos não dispõe do maquinário de regulação da transcrição usualmente encontrado em eucariotos (KRAMER, 2012).

2.2 MECANISMO DE TRADUÇÃO EM EUCARIOTOS

O controle da expressão gênica em eucariotos se dá pela existência de fatores de transcrição, os quais são ligantes específicos que reconhecem determinadas regiões do DNA e favorecem o processo de transcrição a partir de sinais intracelulares resultantes de variadas condições fisiológicas. Entretanto, a presença desses fatores de transcrição não é comum a todos os eucariotos, sendo tripanossomatídeos um exemplo em que a regulação da expressão gênica se dá majoritariamente em etapas pós-transcricionais (NASCIMENTO, 2012; ZORIO; BENTLEY, 2004). Existem também no mRNA sequências regulatórias específicas, sendo um exemplo importante as sequências ricas em adeninas e uridinas (*AU-rich elements*), que são regiões alvo para a ação de complexos de degradação de mRNA e onde diversas proteínas podem ligar-se para estabilização ou desestabilização da

molécula, assim alterando sua meia-vida na célula. Já o mecanismo de tradução, um dos mais complexos do maquinário celular eucarioto, possui diversos passos de regulação mediados por inúmeros fatores que interagem com a maquinaria e alteram seu funcionamento.

Antes de ser traduzida, a molécula de pré-mRNA deve passar por processos de maturação, sendo as principais etapas a síntese do *cap* na extremidade 5', a remoção dos íntrons através do processo de *splicing* e a poliadenilação na extremidade 3'. O *splicing* pode ocorrer por mecanismo de *cis-splicing*, caracterizado pela união de moléculas de mRNA vindas de um mesmo transcrito inicial, ou *trans-splicing*, em que moléculas de mRNA transcritas a partir de genes diferentes são unidas para formação o mRNA final. O *trans-splicing* é comum em protozoários, em especial em cinetoplastídeos, para maturação dos pré-mRNAs policistrônicos (MARTINS & MACIEL FILHO, 2010).

Do ponto de vista estrutural, um mRNA maduro possui uma estrutura denominada *cap*, comumente formada pela adição de um nucleotídeo guanosina metilado na posição do carbono 7, à extremidade 5' do mRNA (*cap* m⁷G ou *cap0*) através de uma ligação trifosfato. Há também variantes espécie-específicas de *cap* em outros eucariotos. Para formação do mRNA maduro ocorre também a adição de uma cauda poliadenilada (cauda poli-A) à extremidade 3', formada a partir de clivagens da região 3' após a transcrição e adição de 60 a 250 adeninas monofosfatadas à sequência, processo catalisado por um complexo multi-proteico no qual está presente a enzima poliadenilato polimerase. Isso permite que os complexos proteicos formados pelos fatores de iniciação da tradução liguem-se a esse mRNA e promovam a circularização do mesmo, essencial para o início da tradução (AITKEN; LORSCH, 2012).

Para que a tradução possa ocorrer, é necessária a interação entre o ribossomo e a molécula de mRNA, a qual é mediada por proteínas denominadas fatores de iniciação da tradução ou eIFs, do inglês *eukariotic initiation factors*. Dois complexos principais formados por eIFs estão envolvidos na união do mRNA ao ribossomo, como representado na figura 1.

O complexo PIC/43S (do inglês *pre-initiation complex*), é formado pela união da subunidade 40S do ribossomo e as proteínas eIF3, constituídas de nove subunidades estruturais que ancoram o complexo, eIF2, que catalisa o acoplamento do Metionil-tRNA ao ribossomo através da quebra de um GTP, e que junto a esse

tRNA e o GTP forma o complexo ternário, e os fatores eIF1 e eIF1A, que interagem com o eIF3 e a subunidade 40S do ribossomo estabilizando a conformação aberta do complexo e assim permitindo a ligação do Metionil-tRNA ao sítio A (HINNEBUSCH, 2006).

Já o complexo heterotrimérico responsável por carrear o mRNA maduro ao ribossomo, denominado eIF4F, é formado pelas proteínas eIF4G, eIF4E e eIF4A. A eIF4G é a proteína de ancoragem que realiza as interações com as demais proteínas do complexo, e é também a responsável pela interação do complexo eIF4F com o complexo PIC para o início do processo de tradução. A eIF4E realiza a ligação do complexo ao *cap* presente no mRNA, e a eIF4A (helicase) promove a remoção de estruturas secundárias do mRNA. Por fim, une-se ao complexo a PABP (*Poli-A binding protein*) ligada à cauda poli-A, assim gerando a configuração do mRNA em alça, processo conhecido como circularização transiente (GINGRAS; RAUGHT; SONENBERG, 1999).

Para o início efetivo da tradução, o eIF3 do complexo PIC interage com a proteína eIF4G unindo os complexos e assim posicionando a subunidade 40S junto ao mRNA. Com o acoplamento do Metionil-tRNA e da à subunidade 40S, a subunidade 60S é carregada pelo fator IF5B e unida à subunidade 40S pela quebra de um GTP, formando o ribossomo completo e permitindo o início do processo traducional (HINNEBUSCH, 2014).

Nesse contexto, a eIF4E possui função central por realizar diretamente a ligação do complexo eIF4F ao mRNA através do *cap*, assim permitindo que através da interação entre eIF4F e PIC, o ribossomo possa iniciar a tradução. Um dos mecanismos naturais de inibição da iniciação da tradução se dá nesse contexto, em que a proteína de ligação à eIF4E (*eIF4E-binding protein*, eIF4E-BP) compete pela ligação entre tal proteína e a eIF4G e impede a formação do complexo maduro (PAPADOPOULOS et al., 2014).

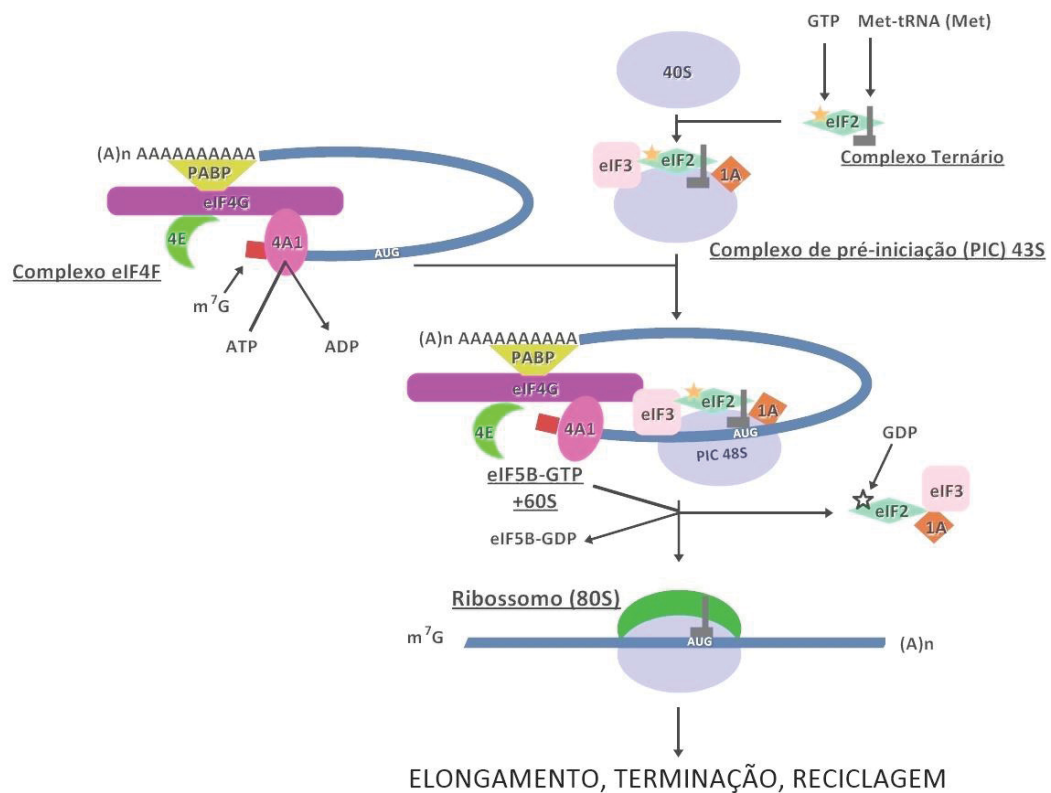


Figura 1 - Representação esquemática do processo de iniciação da tradução em eucariotos.

Adaptado de KLANN e colaboradores (2004). O complexo eIF4F interage com o mRNA através das estruturas do *cap* e da cauda poli-A, e ao interagir com o complexo PIC/43S, permite que a subunidade 40S e o tRNA (Met-tRNA) sejam posicionados junto ao códon de iniciação (AUG). Com a posterior união das subunidades 40S e 60S, o ribossomo completo é formado e inicia-se o processo de alongamento da fita de mRNA.

A eIF4E tem em mamíferos 3 homólogos caracterizados, e em *Saccharomyces cerevisiae* apenas um homólogo. Em mamíferos, a homóloga eIF4E1 é a mais abundante na formação do eIF4F, enquanto as demais homólogas ainda não tiveram sua função elucidada. Com relação à distribuição, as homólogas eIF4E1 e 2 são encontradas na grande maioria dos tecidos, enquanto a eIF4E3 foi detectada somente em tecidos musculares e no pulmão (JOSHI; CAMERON; JAGUS, 2004).

Em seres humanos existem 3 homólogos da eIF4G identificados, sendo a eIF4G1 a mais abundante na formação do complexo eIF4F (AITKEN; LORSCH, 2012; KLANN; DEVER, 2004). A eIF4G possui regiões de alta homologia em eucariotos, onde ocorrem as ligações das demais proteínas do complexo, destacando-se os domínios conservados MIF4G (*IF4G middle domain*), MA3 e W2 onde ocorrem as interações com o complexo PIC, eIF4A e a proteína quinase Mnk,

respectivamente. Além disso, a região N-terminal contém a sequência aminoacídica YXXXXLΦ, conhecida como hélice canônica, na qual Φ representa aminoácidos hidrofóbicos, como motivo de ligação conservado para a eIF4E, interagindo com o motivo conservado VXXFW presente na última. Esse mesmo motivo conservado é encontrado nas proteínas 4E-BP (4E-*binding protein*), as quais competem pela interação com a eIF4E assim participando da regulação da iniciação da tradução (SAFAEE et al., 2012).

2.3 MAQUINARIA DE TRADUÇÃO EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Dentre os pontos de regulação da expressão gênica possíveis em tripanossomatídeos, estão os processos de *trans-splicing* do mRNA policistrônico, transporte do mRNA maduro, *turnover* (degradação do mRNA após a tradução) e a iniciação da tradução (CLAYTON, 2016). A regulação da transcrição nesses organismos não ocorre através de fatores de transcrição, enfatizando a importância dos processos subsequentes para a produção das proteínas (NASCIMENTO, 2012).

Como anteriormente mencionado, em tripanossomatídeos os genes são transcritos na forma de pré-mRNAs policistrônicos contendo as sequências codificadoras de várias proteínas, e para a maturação desses mRNAs é necessário o processo específico de *trans-splicing*. O processo consiste na separação dos genes em mRNAs independentes, aos quais são incorporados mini éxons (39n) na extremidade 5'. Os mini-éxons, previamente à sua ligação aos genes independentes, recebem metilações em sua extremidade 5' formando o *cap4* (MARTINS; MACIEL FILHO, 2010; NELSON; COX, 2014). Tripanossomatídeos apresentam dois ou mais *clusters* policistrônicos, os quais podem ser transcritos em direção favorável ou contrária à posição dos telômeros. Os genes contidos nesses *clusters* raramente geram produtos proteicos de função relacionada, diferindo dos *operons* (LOPES et al., 2010; MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010).

Outra particularidade em tripanossomatídeos é a ocorrência do *cap4*, uma estrutura de *cap* do mRNA única desses organismos, o que sugere particularidades em mecanismos regulatórios de expressão gênica. O *cap4* é formado pelo *cap0* (m⁷GTP) e quatro nucleotídeos (AACU) contendo metilações em suas riboses, além de duas metilações de base na primeira adenosina e uma na quarta uridina, como representado na figura 2 (ZINOVIEV; SHAPIRA, 2012).

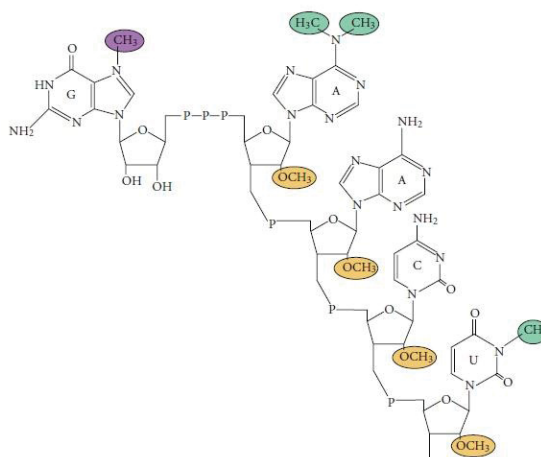


Figura 2 - Representação do *cap4* presente em tripanossomatídeos.

Fonte: ZINOVIEV e colaboradores, 2012.

Em relação às proteínas que formam o complexo eIF4F, a eIF4E apresenta 6 homólogos (EIF4E) em tripanossomatídeos (ASLETT et al., 2009; FREIRE et al., 2017). Observa-se nos membros do gênero *Trypanosoma* que os homólogos EIF4E3 e EIF4E4 apresentam uma extremidade N-terminal mais longa, que vem sendo relacionada à regulação da tradução através de processos de fosforilação (PEREIRA et al., 2013). Já a eIF4G possui 5 homólogos no gênero *Leishmania* e em *T. brucei* e *T. cruzi* (EIF4G), as quais possuem os domínios conservados MIF4G e MA3 (ASLETT et al., 2009; FREIRE et al., 2014a). A variabilidade de proteínas componentes do complexo eIF4F em Tripanossomatídeos assim como a presença de interações únicas entre tais fatores nesses organismos indicam a especificidade da maquinaria (LOPES et al., 2010).

Diversas interações específicas já foram descritas entre componentes do complexo eIF4F em tripanossomatídeos. Em espécies de *Leishmania* foi detectada a interação entre EIF4E3 e EIF4G4, e EIF4E4 e EIF4G3, constituindo os pares de interação de papel mais importantes na formação do complexo eIF4F descritos até o momento (YOFFE et al., 2009). Também em *Leishmania*, a helicase EIF4A1 interage especificamente com a proteína de ancoragem EIF4G3, que também é capaz de ligar-se à PABP-1. O único caso de interação direta descrito atualmente de uma eIF4E e a PABP ocorre também nesse organismo, entre EIF4E4 e PABP-1 (ZINOVIEV; SHAPIRA, 2012).

Em *T. brucei*, a EIF4E6 interage com a EIF4G5 (FREIRE et al., 2014b), e a EIF4E5 com a EIF4G2 (FREIRE et al., 2014a), sendo este um par de interação de

importância vital, visto que a EIF4E5 mostrou-se essencial em formas sanguíneas quando realizado o *knockdown* gênico (NASCIMENTO, 2012). Dados referentes às interações entre proteínas já descritas em tripanossomatídeos são apresentados na tabela 1.

A ligação das homólogas EIF4E à análogos do *cap* do mRNA também apresenta especificidades. Em experimentos de interação utilizando análogos do *cap*, as homólogas de *Leishmania major* LmEIF4E1 e LmEIF4E4 interagem tanto com m⁷GTP quanto com o *cap4* com afinidade semelhante. A LmEIF4E2 interage cerca de 7 vezes mais fortemente com o *cap4* que com o m⁷GTP, enquanto para a LmEIF4E3 a interação é cerca de 8 vezes mais forte com o m⁷GTP do que com o *cap4*. Todas as constantes de dissociação determinadas estão na ordem de micromolar, portanto são interações mais fracas que as realizadas pela homóloga humana com o *cap*, as quais estão na ordem de nanomolar (YOFFE et al., 2006).

Em *Trypanosoma brucei*, foi descrita afinidade ligeiramente maior da EIF4E5 pelo m⁷GTP com relação ao *cap4* (FREIRE et al., 2014a), enquanto a homóloga EIF4E6 apresenta afinidade equivalente pelo m⁷GTP e pelo *cap4* (FREIRE et al., 2014b). Assim como nas homólogas em *L. major*, as K_d determinadas estão na ordem de micromolar. Para as demais homólogas em *T. brucei*, as proteínas TbEIF4E1, TbEIF4E2 e TbEIF4E4 foram capazes de interagir com resinas contendo m⁷GTP imobilizado, indicando padrão de interação semelhante ao encontrado nas homólogas do gênero *Leishmania* (FREIRE et al., 2011).

Tabela 1 - Interações já caracterizadas entre fatores de iniciação de tradução de tripanossomatídeos.

				(continua)
	<i>Proteína</i>	<i>Interage com</i>	<i>Método</i>	<i>Fonte</i>
<i>Leishmania spp.</i>	IF4E1	IF4G3	Duplo híbrido em levedura /Pulldown/Gradiente de polissomos associado à imunoblotting/RMN	YOFFE, 2009
<i>Leishmania spp.</i>	IF4E3	IF4G4	Pulldown/Coimunoprecipitação	FREIRE, 2011

				(conclusão)
Organismo	Proteína	Interage com	Método	Fonte
<i>Leishmania spp.</i>	IF4E4	IF4G3	Duplo híbrido em levedura / <i>Pulldown</i> /Gradiente de polissomos associado à <i>imunoblotting</i> /RMN	YOFFE, 2009
<i>Leishmania spp.</i>	IF4A1	IF4G3	Duplo híbrido em levedura/ <i>Pulldown</i>	ZINOVIEV, 2011
<i>Leishmania spp.</i>	PABP-1	IF4G3	Duplo híbrido em levedura/ <i>Pulldown</i>	ZINOVIEV, 2011
<i>Leishmania spp.</i>	PABP-1	IF4E4	Duplo híbrido em levedura/ <i>Pulldown</i>	ZINOVIEV, 2011
<i>T. brucei</i>	IF4E5	IF4G1	Duplo híbrido em levedura/ <i>Tandem affinity chromatography</i> associada à espectrometria de massas	FREIRE, 2014a
<i>T. brucei</i>	IF4E5	IF4G2	Duplo híbrido em levedura/ <i>Tandem affinity chromatography</i> associada à espectrometria de massas	FREIRE, 2014a
<i>T. brucei</i>	IF4E6	IF4G5	Duplo híbrido em levedura/Coimunoprecipitação	FREIRE, 2014b
<i>T. cruzi</i>	IF4E3	IF4G4	Duplo híbrido em levedura	Colaboradores*
<i>T. cruzi</i>	IF4E3	PABP-1/2	Duplo híbrido em levedura/Coimunoprecipitação	Colaboradores*
<i>T. cruzi</i>	IF4E4	IF4G3	Duplo híbrido em levedura	Colaboradores*
<i>T. cruzi</i>	IF4E5	IF4G1	Duplo híbrido em levedura	Colaboradores*
<i>T. cruzi</i>	IF4E5	IF4G5	Duplo híbrido em levedura	Colaboradores*
<i>T. cruzi</i>	IF4E6	IF4G5	Duplo híbrido em levedura	Colaboradores*

*Dados não publicados de nossos colaboradores

Tendo em vista as interações descritas na literatura em comparação às descritas nos experimentos iniciais do projeto, realizados por nossos colaboradores

do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica (ICC/Fiocruz-PR), a interação TcEIF4E5-TcEIF4G5 destaca-se por ter sido descrita apenas em *T. cruzi* até o momento.

2.4 OS FATORES DE INICIAÇÃO DE TRADUÇÃO EIF4E

Em eucariotos superiores, a família eIF4E é subdividida nas subfamílias eIF4E1, eIF4E2 (4E-HP ou 4E-Homolog protein) e eIF4E3, sendo caracterizada, como mencionado, pela presença de um domínio altamente conservado denominado domínio eIF4E. O homólogo eIF4E1, ou simplesmente eIF4E, é o de função mais estudada na formação do eIF4F (JOSHI; CAMERON; JAGUS, 2004). Estruturas tridimensionais de eIF4E de diversos organismos foram determinadas através de cristalografia de raios-X ou ressonância magnética nuclear em complexo com análogos do *cap* e peptídeos proteicos, revelando detalhes das regiões de interação com seus parceiros na maquinaria de tradução (GRUNER et al., 2016; MARCOTRIGIANO et al., 1997; TOMOO et al., 2002; VOLPON et al., 2006, entre outros).

A estrutura do domínio conservado eIF4E é caracterizada por pelo menos 7 fitas- β antiparalelas ladeadas por 3 ou mais α -hélices, além da conservação de pelo menos 8 resíduos de triptofano ao longo da sequência, destacando-se o W73 (numeração na eIF4E1 humana), presente no motivo conservado de interação com a eIF4G (motivo VXXFW), e os resíduos W56 e W102, formadores do *sandwich stacking* envolvido na interação com o *cap* do mRNA. Essa estrutura é conservada e gera o arcabouço de resíduos básicos característico de interação com os fosfatos do *cap* do mRNA, além de permitir o posicionamento correto dos resíduos envolvidos na interação do tipo *sandwich stacking* com a base nitrogenada (DE BENEDETTI; GRAFF, 2004; ROSETTANI et al., 2007), como representado na figura 4.

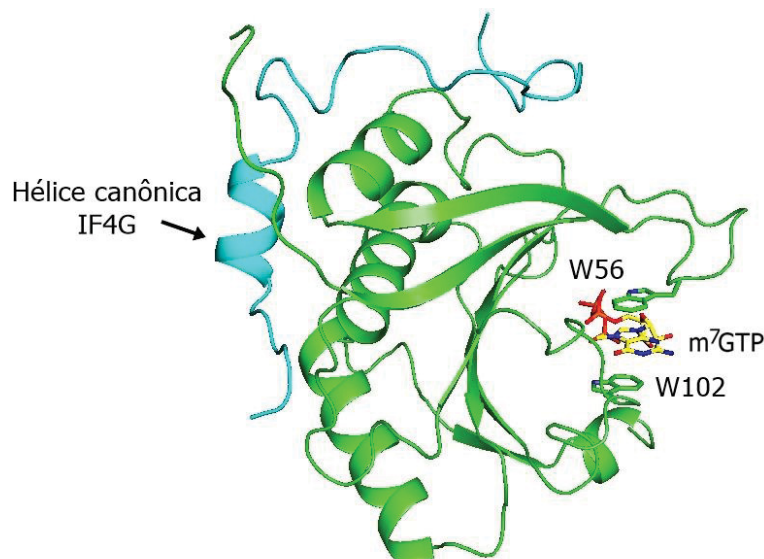


Figura 3 - Representação da estrutura de eIF4E1 humana em complexo com o análogo de *cap* m⁷GTP e o peptídeo de IF4G humana.

A eIF4E humana (PDB: 5T46) é representada em verde, e o peptídeo que contém a hélice canônica de interação da eIF4G é representado em azul. As cadeias laterais dos triptofanos que participam da interação com o m⁷GTP estão identificadas.

Além dos resíduos de triptofano na região côncava da proteína que realizam o *stacking* da base do *cap0*, há um resíduo ácido altamente conservado imediatamente após o triptofano 102 (E103) que realiza ligações de hidrogênio com o grupamento metil presente na base nitrogenada. Além disso, pelo menos outros 3 resíduos básicos conservados (R112, R157, K162) estão envolvidos na interação com os grupos fosfato presentes (CALERO et al., 2002; NIEDZWIECKA et al., 2002).

Membros da subfamília eIF4E2 (4E-HP) apresentam em humanos o triptofano 56 substituído por uma tirosina (Y78), cuja região na proteína estabiliza-se na presença do ligante *cap* (ROSETTANI et al., 2007). A eIF4E3 também não apresenta o sanduíche de resíduos aromáticos característico, havendo uma substituição do W56 por uma cisteína (C52). Além disso, a eIF4E3 apresenta uma região C-terminal que participa da estabilização da interação com o *cap* (OSBORNE et al., 2013). Outras proteínas ligadoras de *cap* que apresentam diferenças no padrão de resíduos aromáticos são a polímerase $\lambda 3$ de Reovírus, que acopla o m⁷GTP entre duas cadeias alifáticas extensas, e a DcpS (enzima *decapping* de *Coragyps atratus*), que o faz com resíduos de treonina e leucina e no qual apenas a treonina parece apresentar essencialidade para a interação (GU et al., 2004; TAO et al., 2002).

Além da interação com o *cap* do mRNA, sendo parte do complexo eIF4F, a eIF4E interage com a eIF4G através de resíduos conservados em sua região N-terminal (figura 4), os quais interagem com os resíduos da hélice canônica (YXXXXLΦ) presente na eIF4G. Na eIF4E1 humana, os resíduos principais envolvidos são H37, P38 e L39, que estabelecem interação hidrofóbica com a tirosina (Y612) da hélice da eIF4G, enquanto os resíduos V69, W73 e L135 interagem com as leucinas (L617 e L618) presentes na hélice. Contatos adicionais providos por regiões hidrofóbicas de ambas as proteínas ajudam na estabilização da interação (GRUNER et al., 2016). Destaca-se que a afinidade de ligação da eIF4E1 ao *cap* ocorre mesmo com a proteína em sua forma livre, porém, quando ligada ao complexo eIF4F, a proteína passa a ter uma afinidade a seu ligante dez vezes maior, indicando seu papel central no processo de iniciação da tradução (PRÉVÔT; DARLIX; OHLMANN, 2003).

As homólogas eIF4E2 e eIF4E3 presentes em mamíferos possuem função pouco esclarecida. Ensaio *in vitro* mostram que a interação entre a proteína humana eIF4E2 e as proteínas eIF4G (eIF4GII) e 4E-BP é cerca de 100 vezes mais fraca quando comparada à eIF4E1, e quando considerados os análogos *cap*, a afinidade se mostra de 9 a 200 vezes menor, evidenciando a funcionalidade ainda desconhecida porém claramente diferenciada dessa proteína com relação à eIF4E1 (ROSETTANI et al., 2007). Já a eIF4E3 parece não interagir com a eIF4G, apresentando resíduos em sua superfície diferentes da eIF4E1, porém é capaz de interagir com o m⁷GTP 1000 vezes mais fortemente que com o GTP (OSBORNE et al., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TESTE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS E CONSTRUÇÕES

Os códigos dos genes que codificam as proteínas submetidas a testes de expressão bem como suas massas moleculares estão contidos na tabela 2.

Tabela 2 – Alvos de interesse nos testes de expressão.

Código no Genbank	Proteína	Massa molecular (kDa)
EKG03420.1	TcEIF4E1	28,9
EKG03006.1	TcEIF4E2	28,6
EKG06230.1	TcEIF4E3	48,5
EKG05813.1	TcEIF4E4	45,1
EKG01513.1	TcEIF4E5	22,6
ESS69948.1	TcEIF4E6	21,4
ESS68156.1	TcEIF4G2	113,3
EKG08349.1	TcEIF4G5	84,5

Os genes que codificam as proteínas TcEIF4E (1-6), TcEIF4G2 e TcEIF4G5 foram clonados em vetores de expressão pDEST17 (em fusão com hexahistidinas) e pDEST15 (em fusão com cauda de GST), contendo marca de seleção por ampicilina. A clonagem foi realizada por uma das colaboradoras do projeto, doutoranda Jimena Ferreira do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica (ICC/Fiocruz-PR). Bactérias *E. coli* cepas BL21 (DE3) STAR e BL21 (DE3) Δ SlyD_pRARE2 foram transformadas com os vetores, sendo a segunda uma cepa que contém o plasmídeo pRARE2, que contém regiões codificantes de tRNAs de códons raros à maquinaria procariótica e uma marca de seleção por cloranfenicol. A transformação foi realizada por choque térmico, seguida de plaqueamento em meio LB ágar contendo os respectivos antibióticos de seleção (ampicilina 50 μ g/mL; cloranfenicol 34 μ g/mL; canamicina 25 μ g/mL). As colônias isoladas foram cultivadas a 37 °C e 200rpm em meio LB (Luria-Bertani) líquido (70mL), contendo também os antibióticos, até atingirem a densidade ótica (DO₆₀₀) de 0,6-0,8. A indução da expressão foi realizada em 50mL dessa cultura com 0,2 mM de IPTG, por 4h a 37 °C ou em período *overnight* (15-16 horas) a 18 °C, sob agitação de 200rpm, restando 20mL como controle não induzido. As culturas foram centrifugadas a 6000 x g por 15

minutos, e o *pellet* foi ressuspensionado em tampão de lise (50 mM de Tris-HCl pH 8,0; 0,2 M de NaCl). As suspensões foram então congeladas em gelo seco por 20 minutos e descongeladas em gelo, e a elas foi adicionada lisozima (200 µg/mL), sendo mantida agitação por 30 minutos em gelo. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 10000 x g por 30 minutos para a separação dos extratos solúvel e insolúvel. A fração insolúvel foi ressuspensionada em tampão de lise e todas as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).

Uma das proteínas de interesse, a TcEIF4G5, não apresentou expressão nos testes realizados com a construção incluindo a sequência completa da proteína. Assim, a fim de realizar testes de expressão com fragmentos truncados da TcEIF4G5, foram desenhadas as seguintes construções: TcEIF4G5_ΔC (resíduos 1-317), TcEIF4G5_Ntrunc (resíduos 75-317) e TcEIF4G5_MIF (resíduos 142-317). Para as construções da proteína TcEIF4G5, genes sintéticos otimizados para a expressão em sistema procarioto foram adquiridos (GeneCust), subclonados em vetor pET28a (em fusão com hexahistidinas C-terminal). Os testes de expressão para essas construções foram realizados em *E. coli* BL21 (DE3) STAR em condição de expressão a 18 °C *overnight* sob agitação de 200 rpm na presença de 0,2 mM de IPTG.

3.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA TcEIF4E1

A expressão da TcEIF4E1 foi realizada em *E. coli* BL21 (DE3) ΔSlyD_pRARE2 em volume de 2L de cultivo por processo de purificação. Os cultivos foram realizados a 37 °C sob agitação de 200 rpm em período de 4 a 6 horas, até atingir a DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Após o crescimento, os cultivos foram aclimatados por 30 minutos a 18 °C e posteriormente feita a indução da expressão com 0,2 mM de IPTG em período *overnight*. Após a indução, as culturas foram centrifugadas a 6000 x g por 15 minutos e o precipitado obtido foi ressuspensionado em 30 mL de tampão A da cromatografia de afinidade (composição específica de acordo com cada proteína) em presença de inibidor de protease SIGMAFAST™ *protease inhibitor cocktail tablet* (Sigma-Aldrich), e submetido à lise de alta pressão (Microfluidics™) a 80 psi, com separação das frações solúvel e insolúvel por centrifugação a 40000 x g por 30

minutos. O sobrenadante de centrifugação foi então submetido à purificação em sistema AKTA FPLC (GE Healthcare).

A cromatografia de afinidade foi realizada em coluna HisTrap HP 5 mL (GE Healthcare) com os tampões A (50 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,3 M NaCl e 20 mM de Imizadol) e B (50 mM de Tris-HCl pH 8,8; 0,3 M de NaCl e 0,5M de Imidazol), em um gradiente em 0 a 19% de tampão B em 6 VC (volume de coluna) e de 19% a 100% de B em 14 VC, precedido de lavagem com 4 VC em tampão A. As frações obtidas foram analisadas em SDS-PAGE e também através dos cromatogramas obtidos, sendo as frações de interesse reunidas para o prosseguimento da purificação. Para a diminuição da concentração de sal do *pool* de amostras, o mesmo foi dialisado em período *overnight* contra tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,8 e 15 mM NaCl. A amostra foi então centrifugada por 15 minutos a 20000 x g e submetida à cromatografia de troca iônica. Na cromatografia de troca iônica foi utilizada a coluna HiTrap Q-Sepharose 5 mL (GE Healthcare). Foi aplicado um método linear com os tampões A (50 mM de Tris-HCl pH 8,8) e B (50 mM de Tris-HCl pH 8,8 e 1 M de NaCl) em gradiente de 0 a 100% de tampão B em 20 VC, com 3 VC de lavagem após a aplicação da amostra, sendo novamente as frações eluídas analisadas e selecionadas. Para a cromatografia de exclusão por tamanho, a proteína foi concentrada em concentrador de filtro 3K (Amicon® Ultra) a um volume de 1 mL e centrifugada por 15' a 20000 x g, sendo então aplicada numa coluna Superdex 75 16/600 (GE Healthcare), sendo realizada uma eluição isocrática em 1 VC da coluna com tampão contendo 20 mM de Tris-HCl pH 8 e 150 mM de NaCl.

3.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA TcEIF4E5

A expressão da homóloga TcEIF4E5 foi realizada em *E. coli* BL21 (DE3) Δ SlyD_pRARE2 em volume de 1L de cultivo por processo de purificação. A produção da proteína foi realizada seguindo o mesmo procedimento usado para a TcEIF4E1, sendo por fim a fração solúvel obtida do processamento dos cultivos aplicada na purificação em sistema AKTA FPLC (GE Healthcare).

A cromatografia de afinidade foi realizada na coluna HisTrap HP 5 mL com os tampões A (50 mM de Tris-HCl pH 8; 0,5 M de NaCl e 20 mM de Imizadol) e B (50 mM de Tris-HCl pH 8; 0,5 M de NaCl e 0,5M de Imizadol). Foram utilizados 4 VC de lavagem em tampão A seguidos de gradiente de 0 a 19% de tampão B em 6 VC, 3

VC nessa mesma porcentagem de tampão B, e gradiente de 19% a 40% de tampão B em 6 VC. De forma semelhante à TcEIF4E1, as frações foram selecionadas e o *pool* foi dialisado, contra tampão 50 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM NaCl. Visando evitar a oligomerização da proteína, adicionou-se ao tampão de diálise 2 mM DTT. A amostra foi então centrifugada por 15 minutos a 20000 x g e levada à cromatografia de troca iônica. A cromatografia de troca iônica foi realizada com uma coluna HiTrap SP 5 mL em um método linear com os tampões A (50 mM de Tris-HCl pH 8) e B (50 mM de Tris-HCl pH 8; 1 M de NaCl) num gradiente de 0 a 100% de tampão B em 20 VC, com ambos os tampões contendo também 2 mM DTT. De forma idêntica à TcEIF4E1, a amostra foi concentrada para 1 mL e centrifugada por 15 minutos a 20000 x g, sendo então submetida à cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna Superdex 75 16/600 (GE Healthcare), em um método de eluição isocrática de 1 VC da coluna em tampão contendo 20 mM de Tris-HCl pH 8, 150 mM de NaCl e 2 mM DTT.

3.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DA TcEIF4G5

A expressão das construções da TcEIF4G5 foi realizada em *E. coli* BL21 (DE3) STAR. Para a construção TcEIF4G5_ΔC o volume de cultivo foi de 2 L por purificação, e para a TcEIF4G5_MIF, 1 L por purificação. A expressão foi realizada por indução em período *overnight* a 18 °C sob agitação de 200 rpm. Após a indução com 0,2 mM de IPTG, as culturas foram centrifugadas a 6000 x g por 15 minutos e os precipitados processados de forma semelhante ao supracitado, por lise de alta pressão e posterior separação do extrato solúvel por centrifugação de 30 minutos a 40000 x g, para posterior cromatografia de afinidade. De forma característica às construções dessa proteína, não pode ser realizada cromatografia de troca iônica devido à instabilidade das proteínas em tampões de baixa força iônica.

3.4.1 Purificação da TcEIF4G5_ΔC

Para a cromatografia de afinidade da TcEIF4G5_ΔC, a fração solúvel dos extratos bacterianos (50 mL) foi aplicada na coluna HisTrap HP 1 mL (GE Healthcare), com os tampões A (50 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,5 M NaCl; 20 mM Imizadol) e B (50 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,5M NaCl; 0,5 M Imidazol), em um método

com lavagem de 10 VC em tampão A, seguido de gradiente de 0% a 15% de tampão B em 30 VC e gradiente de 15% a 100% de tampão B em 25 VC. As frações foram analisadas em SDS-PAGE e nos cromatogramas obtidos, sendo selecionadas para a próxima etapa. Para a cromatografia de exclusão por tamanho, a amostra foi concentrada a um volume de 0,5 mL e centrifugada por 15 minutos a 20000 x g, sendo então aplicada à coluna Superdex 75 10/300 num método de eluição isocrática de 1 VC, em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl e 2 mM DTT.

3.4.2 Purificação da TcEIF4G5_MIF

Para a cromatografia de afinidade da TcEIF4G5_MIF, a fração solúvel dos extratos bacterianos foi aplicada à coluna HisTrap HP 5 mL (GE Healthcare), com os tampões A (50 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,5 M NaCl e 20 mM Imidazol) e B (50 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,5M NaCl e 0,5 M Imidazol). A eluição foi precedida de 5 VC de lavagem em tampão A, e realizada através de gradiente de 0 a 14% de tampão B em 7 VC, 14 a 30% de tampão B em 7 VC e de 30 a 100% de tampão B em 10 VC. As frações foram selecionadas e submetidas à cromatografia de exclusão por tamanho, para a qual a amostra foi concentrada a 1 mL e centrifugada por 15 minutos a 20000 x g, sendo então aplicada à coluna Superdex 75 16/600 (GE Healthcare) em método de eluição isocrática de 1 VC em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,8 e 0,3 M NaCl.

3.5 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

As proteínas TcEIF4E5, TcEIF4E1 e TcEIF4G5_MIF purificadas foram quantificadas e amostras foram enviadas ao Biotério do ICC/Fiocruz-PR para inoculação de camundongos Swiss, sendo utilizados 4 animais por proteína e 4 doses contendo 100 ug de proteína por inoculação. Os soros obtidos foram aliquotados e estocados a -20 °C. O teste dos soros obtidos foi realizado através de *Western blot*, com aplicação de aproximadamente 300 ng de proteína por poço em SDS-PAGE e transferência das amostras para membrana de PVDF (GE Healthcare), por 30 minutos a 20 V. Após a transferência, a membrana foi bloqueada em período *overnight* a 4 °C sob agitação leve em tampão TBS 1x contendo 5% (p/v) de leite em pó. Lavagens sucessivas foram realizadas previamente à incubação com o soro

policlonal, testado em diluição de 1:200 a 1:2000 e incubado por 2 horas em temperatura ambiente. O anticorpo anti-*mouse* conjugado à Fosfatase Alcalina (ThermoFischer) foi incubado em diluição 1:10000 por 1 hora e a revelação realizada em tampão pH 9,6 em presença de substratos comerciais (Sigma-Aldrich). Após a revelação a reação foi parada com solução 0,1 M EDTA.

3.6 EXPERIMENTOS DE DICROÍSMO CIRCULAR

Amostras purificadas da TcEIF4E1, TcEIF4E2 (produzida e purificada pela auxiliar técnica Brenda Ribeiro) e TcEIF4E5 foram submetidas à análise por dicróismo circular, com medida no intervalo de 190 a 260 nm. Para a TcEIF4E1 foi utilizada uma cubeta de caminho ótico 1 mm com a amostra em concentração de 5 μ M, em tampão 20 mM Fosfato de Sódio pH 8 e 50 mM Sulfato de Sódio. Para a TcEIF4E2 foi utilizada também uma cubeta de 1 mm com a amostra em concentração de 3 μ M, no mesmo tampão utilizado para a TcEIF4E1. A TcEIF4E5 foi aplicada numa cubeta de 2 mm, em concentração de 3,5 μ M, em tampão 8 mM Fosfato de Sódio pH 8, 5 mM Sulfato de Sódio e 0,3 mM DTT.

O sinal de CD foi convertido em elipticidade molar (θ_{MWR}) através da equação:

$$[\theta]_{MWR} = MWR \times \theta / 10 \times [C] \times [L]$$

Na qual MWR representa a massa molecular (Da) dividida pelo número de resíduos da proteína estudada, θ representa o sinal de dicróismo circular em mdeg, [C] representa a concentração da proteína estudada em g/L e [L] representa o caminho ótico da cubeta utilizada em centímetros. O gráfico gerado foi analisado para identificação de padrões de absorção referentes à estrutura secundária das proteínas.

Foram realizados também experimentos de desnaturação térmica, em triplicata. Para tal, o sinal de CD foi monitorado nos comprimentos de onda de 208, 215 e 222 nm. Para a proteína TcEIF4E1, o experimento de desnaturação foi realizado sob mesmas condições de concentração e caminho ótico do experimento de CD, em um gradiente de temperatura de 20 a 95 °C no qual o sinal foi monitorado a cada 1 °C no intervalo de 45 a 55 °C. Para a TcEIF4E2, também foram utilizadas as mesmas condições do experimento de CD, em um gradiente de temperatura de 20 a 70 °C no qual o sinal foi monitorado a cada 1 °C no intervalo de 40 a 60 °C. A TcEIF4E5 foi também submetida à desnaturação sob mesmas condições do

experimento anterior de CD, em um gradiente de temperatura de 20 a 75 °C no qual o sinal foi monitorado a cada 1 °C no intervalo de 40 a 65 °C. Como mencionado, o sinal de CD foi convertido em elipticidade molar e o gráfico foi analisado para determinação aproximada da temperatura de desnaturação.

3.7 ENSAIO DE INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcEIF4E5 E TcEIF4G5-ΔC POR CROMATOGRAPHIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO

Os ensaios de interação por cromatografia de exclusão por tamanho foram realizados na coluna Superdex 75 10/300, inicialmente em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl e 2 mM DTT. Nesse protocolo, amostras de 500 µL das proteínas TcEIF4E5 (70 µM) e construções TcEIF4G5_MIF (70 µM) e TcEIF4G5_ΔC (20 µM) purificadas e centrifugadas (15 minutos a 20000 x g) foram aplicadas de forma individual como controles de eluição. As proteínas TcEIF4E5 e TcEIF4G5_ΔC foram incubadas em misturas equimolares (aproximadamente 10 µM de cada proteína) em volume total de 600 µL por 30 minutos em gelo, sendo as misturas aplicadas em seu volume total na coluna. As frações correspondentes aos picos de eluição foram aplicadas em SDS-PAGE 13% para observação do possível complexo. Para o controle negativo de interação, a proteína TcEIF4E5 foi incubada com a construção TcEIF4G5_MIF, sendo a mistura aplicada à cromatografia de exclusão por tamanho sob as mesmas condições anteriores.

Um segundo ensaio foi realizado em tampão 20 mM Fosfato de Sódio pH 7,5, 50 mM NaCl e 2 mM DTT, utilizando-se a mesma coluna. Para tal, as proteínas TcEIF4E5 e TcEIF4G5_ΔC foram dialisadas em uma mistura equimolar de aproximadamente 20 µM de cada proteína no tampão acima (1,2 mL total). As proteínas foram aplicadas individualmente na coluna em concentração de aproximadamente 20 µM. A mistura dialisada foi aplicada na coluna em volume de 500 µL e as frações coletadas foram igualmente analisadas em SDS-PAGE.

3.8 ENSAIOS DE INTERAÇÃO ENTRE TcEIF4E1 E 4E5 COM ANÁLOGOS DO CAP E TcEIF4E5-TcEIF4G5 POR TERMOFORESE EM MICROESCALA

Para os ensaios de termoforese em microescala foi utilizado o equipamento Monolith NT.115 (NanoTemper). Para geração das curvas de fluorescência, todos os

experimentos envolvendo titulação foram feitos em triplicata. Para o experimento de interação entre as proteínas de interesse e análogos do *cap* do mRNA, as proteínas TcEIF4E1 e TcEIF4E5 foram marcadas utilizando-se o *kit* RED-tris-NTA (NanoTemper) com a sonda NT 647, para marcação não covalente de cauda de hexahistidinas, segundo protocolo do fabricante. Após a marcação, cada proteína foi submetida a um pré-teste de fluorescência em duplicata para avaliação da qualidade de marcação e eventual agregação da amostra no capilar utilizado. Para esses ensaios foram utilizados os análogos do *cap* do mRNA m⁷GTP (Jena Bioscience) e m⁷GTP-A (New England Biolabs), visto que o *cap4*, próprio de tripanossomatídeos, não está disponível comercialmente. Iniciou-se o experimento com concentração de 400 µM de análogo do *cap* com 16 diluições seriadas subsequentes, sendo o volume final do experimento de 20 µL (10 µL de ligante e 10 µL de solução de proteína em concentração de 10 nM). A marcação da proteína e o experimento foram realizados em tampão 20 mM Fosfato de Sódio pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM DTT e 0,05% Tween 20.

Para o ensaio de interação entre a TcEIF4E5 e as construções TcEIF4G5, ambas as proteínas foram marcadas, visando a realização do experimento em ambos os sentidos da interação alternativamente. A marcação foi feita com a sonda NT 647 utilizando o *kit* RED-MALEIMIDE (NanoTemper), para marcação covalente de resíduos de cisteína, segundo manual do fabricante. O tampão utilizado na marcação foi 20 mM Fosfato de Sódio pH 7,5, 50 mM NaCl. As amostras de proteína não marcadas tiveram também seu tampão trocado para o tampão de ensaio (20 mM Fosfato de Sódio pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM DTT e 0,05% Tween 20). A molécula não marcada foi titulada também 16 vezes com volume final do experimento de 20 µL (10 µL da proteína marcada e 10 µL da titulação da segunda proteína). Para o ensaio em que a molécula titulada foi a TcEIF4G5_ΔC, uma concentração máxima de uso (1 mg/mL ou 27,5 µM) foi determinada de acordo com a estabilidade da amostra, sendo, portanto, a concentração de início da titulação de 0,5 mg/mL. Para a construção TcEIF4G5_MIF titulada, a concentração inicial foi também de 1 mg/mL (39 µM), sendo a concentração máxima no experimento metade desse valor.

Para identificação inicial de uma interação, é possível realizar-se uma versão simplificada do experimento somente com duas medidas, uma em presença de alta concentração de ligante e outra com concentração zero (*binding check*). A diferença

entre as medidas de fluorescência é interpretada pelo software e assim é indicada ou não a interação entre as moléculas testadas.

Os dados foram avaliados através do software MO.Affinity Analysis v.2.2.7, (NanoTemper). O software seleciona um tempo de exposição aos raios infravermelho e normaliza o sinal com relação ao nível inicial de fluorescência antes do início do gradiente de temperatura, e gera assim uma curva de fluorescência normalizada a partir da qual é calculada a constante de dissociação. É possível também observar parâmetros de sinal sobre ruído e erro estatístico associado à constante calculada.

3.9 ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO E COLETA DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

As proteínas TcEIF4E1, TcEIF4E5 e TcEIF4G5_MIF foram submetidas à cristalização através do método de difusão de vapor em gota sentada utilizando-se os *kits* comerciais JCSG *plus* (Molecular Dimensions), PACT *premier* (Molecular Dimensions), Index HT (Hampton Research) e PEG Ion (Hampton Research), utilizando-se o equipamento Mosquito (TPP LabTech). A TcEIF4E1 foi utilizada em concentração próxima de 4,5 mg/mL em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8 e 150 mM NaCl, em gotas de volume de 300 a 500 nL, em proporções proteína/reservatório de 1:1 e 1:2. A TcEIF4E5 foi utilizada a 5 mg/mL em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl e 2 mM DTT, também em proporções proteína/reservatório de 1:1 e 1:2 e volumes finais de gota variando de 200 a 600 nL. A TcEIF4G5_MIF foi utilizada a aproximadamente 5,5 mg/mL, em proporção proteína/reservatório 1:1, em volume final de 600 nL. A proteína TcEIF4G5_MIF apresentou uma condição promissora de cristalização no kit JCSG *plus* (0,1 M Cacodilato de Sódio pH 6,5 e 2 M Sulfato de Amônio). Para a TcEIF4E5 cristalizada em conjunto aos análogos do *cap*, as condições iniciais de cristalização foram encontradas no kit INDEX HT (0,1M BIS-TRIS pH 5,5 e 6,5; 0,2M Sulfato de Lítio; 25% PEG 3350). Dado o aparecimento de condições mais favoráveis à precipitação cristalina das proteínas, refinamentos foram desenhados e utilizados a fim de determinar condições exatas de cristalização, nos quais a partir das condições iniciais encontradas nos *kits* as concentrações de sais, precipitantes e também o pH foi alterado. A condição final de cristalização para a TcEIF4G5_MIF foi 0,1 M Cacodilato de Sódio pH 6,5 e 2 M

Sulfato de Amônio. Para a TcEIF4E5 cristalizada em presença de m⁷GTP, a condição final de cristalização foi 0,1M BIS-TRIS pH 6 ou 6,5, 0,2M Sulfato de Lítio e 25% PEG 3350. Para a TcEIF4E5 cristalizada em presença de m⁷GTP-A, a condição final de cristalização foi 0,1M BIS-TRIS pH 6 ou 6,5, 0,2M Sulfato de Lítio e 28% PEG 3350. Dada a determinação das condições, as proteínas foram submetidas à cristalização através de *hanging drop* utilizando assim volumes maiores para a gota, entre 1 e 3 µL em proporção proteína/reservatório de 1:1. Anteriormente à coleta dos dados de difração, os cristais foram transferidos para uma gota contendo a solução de cristalização de cada proteína acrescida de 25% de glicerol, e rapidamente submergidos em nitrogênio líquido.

Os dados de difração de raios X foram coletados na linha de luz PROXIMA 1 do Sincrotron SOLEIL (França) pela Dra. Beatriz Guimarães e o processamento dos dados foi realizado utilizando-se o programa XDS (KABSCH, 2010).

3.10 MODELAGEM POR HOMOLOGIA E COMPARAÇÕES ESTRUTURAIS

Modelos das estruturas tridimensionais das homólogas TcEIF4E foram gerados através da ferramenta I-TASSER (ZHANG, 2008). A partir da análise da sequência primária das 6 homólogas TcEIF4E, selecionou-se as regiões correspondentes ao domínio conservado eIF4E para a geração dos modelos estruturais. Aos modelos gerados são atribuídos valores de *c-score*, que indicam a significância dos *templates* utilizados na modelagem e a concordância entre os parâmetros da modelagem. Os modelos com maiores *c-scores* para cada proteína foram selecionados e submetidos ao alinhamento estrutural com a eIF4E1 humana (PDB: 5T46; 1IPB; 1IPC) através da ferramenta TM-align (ZHANG, 2005), gerando valores de RMSD e TM-score de alinhamento. Os valores de TM-score indicam a semelhança estrutural global entre estruturas comparadas através de um valor de 0 a 1, em que 1 representa máxima similaridade estrutural, valores abaixo de 0,2 indicam que as proteínas foram alinhadas aleatoriamente e valores acima de 0,5 indicam confiabilidade do alinhamento estrutural.

Análises estruturais visando a comparação e identificação de modificações em regiões chave para as interações realizadas pela proteína foram realizadas utilizando-se os programas PyMol (DELANO, 2002) e COOT (EMSLEY; COWTAN, 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENHO DAS CONSTRUÇÕES DA TcEIF4G5

Não foi observada expressão da sequência completa da TcEIF4G5, a qual seria utilizada para análise da interação com a TcEIF4E5. Essa interação é exclusiva de *T. cruzi*, motivo pelo qual houve interesse no desenho de construções truncadas da TcEIF4G5. A partir da identificação *in silico*, através de BLASTp, do domínio característico da família de proteínas eIF4G, o MIF4G, foi realizada a análise da região N-terminal a fim de identificar a sequência canônica de interação com a eIF4E (YXXXXLΦ). Uma sequência parcialmente conservada foi encontrada (82-YDIAEFV-89), com o penúltimo resíduo do motivo canônico de interação, uma leucina, substituído por uma fenilalanina. A realização da predição de estrutura secundária pela ferramenta PSIPRED (BUCHAN et al., 2013) identificou para essa sequência uma α -hélice, sugerindo que essa possa ser a correspondente da hélice canônica na homóloga TcEIF4G5. A partir dessa análise inicial, 3 construções (figura 4) da proteína foram propostas, todas excluindo a região C-terminal da proteína a partir do domínio MIF4G, a qual não é uma região relacionada à interação em análise. A primeira construção, denominada TcEIF4G5_ Δ C, contém toda a região N-terminal da proteína e o domínio MIF4G. A segunda construção, TcEIF4G5_Ntrunc, possui a região N-terminal truncada próximo do motivo parcialmente conservado identificado, além do domínio MIF. A terceira construção, TcEIF4G5_MIF, possui somente o domínio MIF4G, o qual não é relacionado a interações entre eIF4E e eIF4G já caracterizadas.



Figura 4 - Esquema das construções truncadas da TcEIF4G5 em comparação à sequência completa.

Estão identificados o domínio conservado MIF4G e o motivo de interação com a eIF4E parcialmente conservado na região N-terminal.

4.2 TESTES DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para a realização da expressão são desejadas condições de cultivo que gerem alta taxa de expressão e alta solubilidade das proteínas. Os testes com melhores resultados foram das proteínas TcEIF4E1 e TcEIF4E5, com alto rendimento e solubilidade, sendo realizado aumento de escala, seguido da proteína TcEIF4E2, todas em *E. coli* BL21 (DE3) Δ SlyD_pRARE2.

Todas as construções TcEIF4G5 foram expressas na fração solúvel em *E. coli* BL21 (DE3) STAR, com destaque ao alto rendimento e solubilidade da TcEIF4G5_MIF. A tabela 3 mostra um resumo dos resultados de teste de expressão realizados.

Tabela 3 - Resultados dos testes de expressão das proteínas.

Alvo (vetor de expressão)	Massa molecular (kDa)	Expressão	Solubilidade
TcEIF4E1 (pDEST17)	31,6	✓✓✓	✓✓✓
TcEIF4E2 (pDEST17)	31,2	✓✓	✓✓
TcEIF4E3 (pDEST17)	51,2	X	-
TcEIF4E4 (pDEST17)	47,8	✓	X
TcEIF4E5 (pDEST17)	25,2	✓✓✓	✓✓✓
TcEIF4E6 (pDEST17)	24	✓	X
TcEIF4G2 (pDEST15)	140,9	X	-
TcEIF4G5 (pDEST17)	86,6	X	-
TcEIF4G5 (pDEST15)	111,7	X	-
TcEIF4G5_MIF (pET28a)	28,2	✓✓✓	✓✓✓
TcEIF4G5_ΔC (pET28a)	43,6	✓✓	✓✓
TcEIF4G5_Ntrunc (pET28a)	35,8	✓	✓

As proteínas obtidas na fração solúvel apresentaram bom rendimento após as purificações, possibilitando a continuidade dos experimentos. De forma geral, as condições mais favoráveis de expressão solúvel se deram em temperaturas mais baixas, a 18 °C em período *overnight*. Tal comportamento está de acordo com o descrito na literatura, principalmente para proteínas de mais difícil expressão, em que a baixa temperatura otimiza a obtenção do alvo (ROSANO, 2014).

4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA TcEIF4E1

A purificação da TcEIF4E1 foi iniciada através de cromatografia de afinidade, mostrada na figura 5. Devido à presença de impurezas nas amostras coletadas na afinidade, um novo passo de purificação, uma cromatografia de troca iônica, foi realizado.

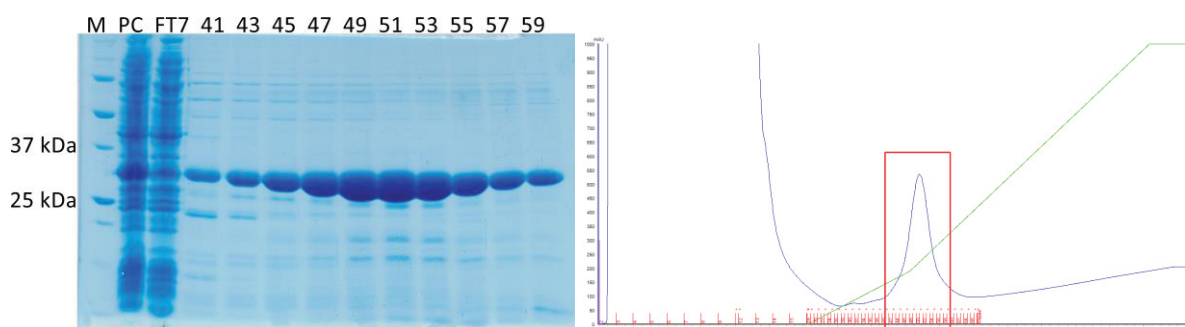


Figura 5 - Resultado da purificação da TcEIF4E1 por cromatografia de afinidade (coluna HisTrap HP 5 mL).

Análise por SDS-PAGE 13% das frações coletadas e cromatograma correspondente, no qual a linha verde representa o gradiente de imidazol da eluição e a linha azul a medida de absorbância a 280 nm (mAU). O retângulo demarca o intervalo de frações aplicadas no gel. (M: marcador de peso molecular; PC: amostra aplicada na coluna; FT: *flowthrough*).

Na cromatografia de troca iônica, foi observado um pico isolado e reproduzível, e uma diminuição considerável da quantidade de contaminantes visível na eletroforese, como demonstrado na figura 6. Por fim, a fim de monitorar a agregação e homogeneidade da amostra, além de eliminar contaminantes ainda presentes, a proteína foi submetida à cromatografia de exclusão por tamanho. A cromatografia de exclusão por tamanho gerou como resultado um pico eluído em 68 mL, majoritário e reproduzível, condizente com o peso monomérico da proteína (31,6 kDa) de acordo com o manual da coluna (figura 7).

O rendimento final da proteína foi de aproximadamente 1 mg de proteína pura por litro de cultivo.

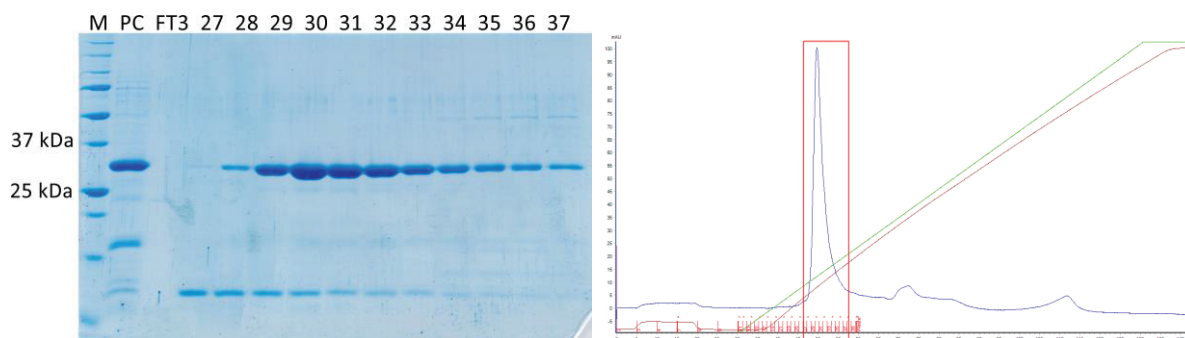


Figura 6 - Resultado da purificação da TcEIF4E1 por cromatografia de troca iônica (coluna HiTrap Q-Sepharose 5 mL).

Análise por SDS-PAGE 13% das frações coletadas na cromatografia e cromatograma correspondente, no qual a linha verde representa o gradiente de NaCl utilizado, a linha marrom representa a condutividade detectada durante a eluição, e a linha azul a medida de absorbância a 280 nm (mAU). O retângulo demarca o intervalo de frações aplicadas no gel. (M: marcador de peso molecular; PC: amostra aplicada na coluna; FT: *flowthrough*).

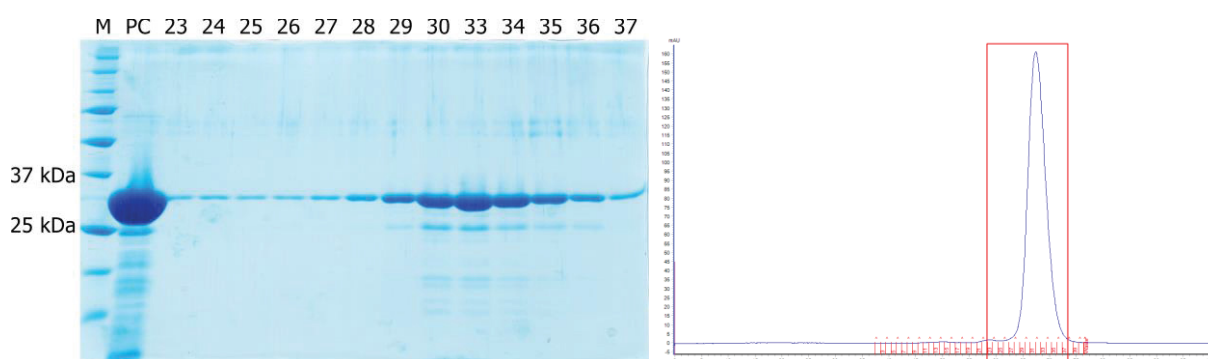


Figura 7 - Resultado da purificação da TcEIF4E1 por cromatografia de exclusão por tamanho (coluna Superdex 75 16/600).

Análise por SDS-PAGE 13% das frações coletadas na cromatografia, realizada na coluna Superdex 75 16/600, e cromatograma correspondente, no qual a linha azul representa a medida de absorbância a 280 nm (mAU). O retângulo demarca o intervalo de frações aplicadas no gel. (M: marcador de peso molecular; PC: amostra aplicada na coluna).

4.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA TcEIF4E5

A proteína TcEIF4E5 foi purificada através de três etapas de cromatografia, sendo elas cromatografia de afinidade, seguida de cromatografia de troca iônica (catiônica) e cromatografia de exclusão por tamanho. Na cromatografia de afinidade observa-se a presença de alguns contaminantes nas amostras coletadas (figura 8), motivo pelo qual a troca iônica foi realizada.

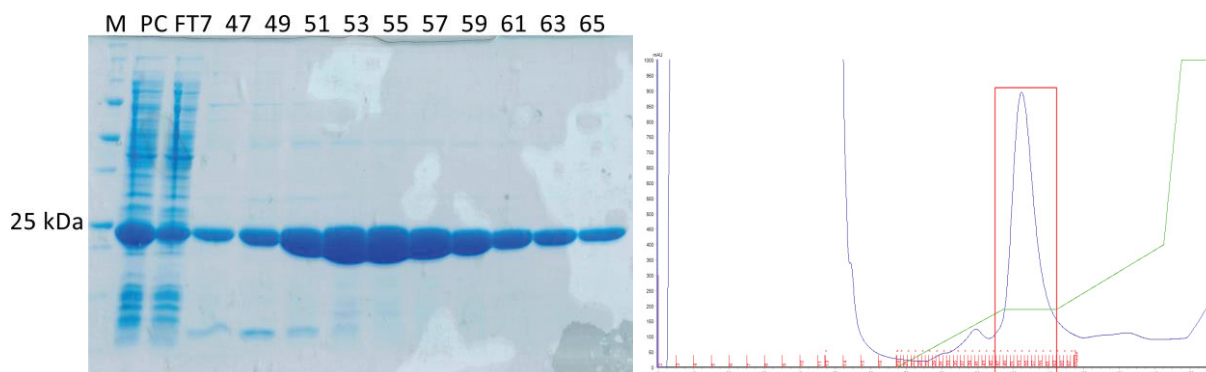


Figura 8 - Resultado da purificação da TcEIF4E5 por cromatografia de afinidade (coluna HisTrap HP 5 mL).

Análise por SDS-PAGE 13% das frações coletadas e cromatograma correspondente, no qual a linha verde representa o gradiente de imidazol da eluição e a linha azul a medida de absorbância a 280 nm (mAU). O retângulo demarca o intervalo de frações aplicadas no gel. (M: marcador de peso molecular; PC: amostra aplicada na coluna; FT: *flowthrough*).

Tendo em vista que o ponto isoelétrico da TcEIF4E5 calculado pela ferramenta on-line ProtParam (ExPASy) é de pH 7,1, esperava-se que em pH acima desse valor a carga líquida da proteína permitiria a realização de uma cromatografia de troca aniônica (SELKIRK, 2004). Assim, foi realizada a cromatografia com a resina Q-Sepharose (GE Healthcare), a qual demonstrou-se ineficiente para ligação da proteína de interesse. Em vista disso, testes de interação com resinas de troca iônica e interação hidrofóbica foram realizados, resultando na escolha da resina SP-Sepharose (GE Healthcare), uma resina catiônica, para a realização da cromatografia. Apesar da alta pureza e bom rendimento, a TcEIF4E5 gerou na troca iônica resultados que indicavam a heterogeneidade de populações da proteína, o que é demonstrado no SDS-PAGE das frações da cromatografia (figura 9).

Tal heterogeneidade também foi verificada na cromatografia de exclusão por tamanho (figura 10). Foram observados dois picos definidos, um eluído em 61 mL (pico 1 na figura 10) e outro em 75 mL (pico 2 na figura 10), o que de acordo com os padrões da coluna, corresponde a massas moleculares próximas de um dímero e um monômero da proteína, respectivamente, confirmando nossas observações iniciais acerca das populações. Nesse caso, a população de interesse para prosseguimento dos experimentos de interação seria a monomérica.

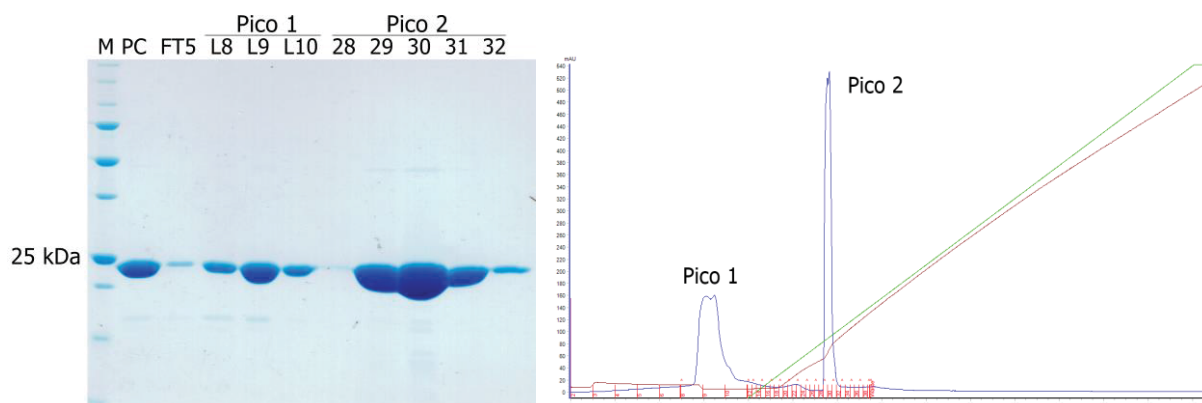


Figura 9 - Resultado da purificação da TcEIF4E5 por cromatografia de troca iônica (coluna HiTrap SP-Sepharose 5 mL).

Análise por SDS-PAGE 13% das frações coletadas na cromatografia e cromatograma correspondente, no qual a linha verde representa o gradiente de NaCl utilizado, a linha marrom representa a condutividade detectada durante a eluição, e a linha azul a medida de absorvância a 280 nm (mAU). (M: marcador de peso molecular; PC: amostra aplicada na coluna; FT: *flowthrough*).

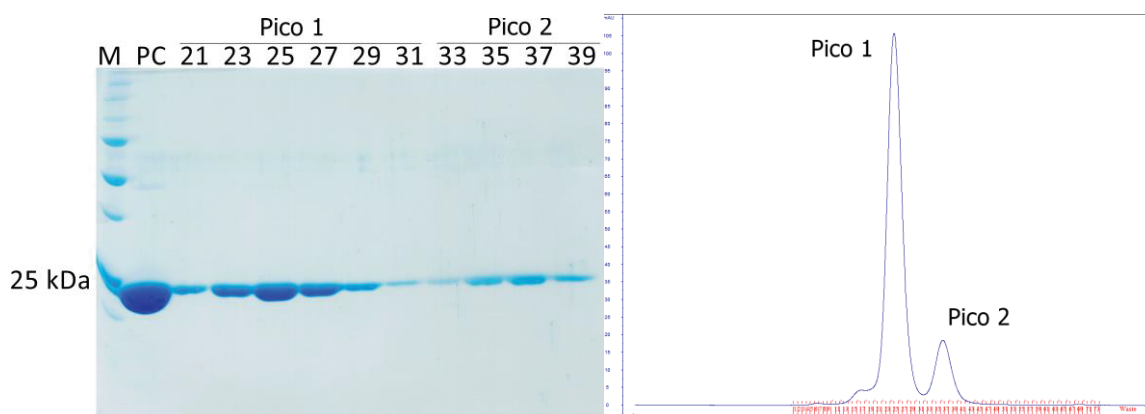


Figura 10 - Resultado da purificação da TcEIF4E5 por cromatografia de exclusão por tamanho (coluna Superdex 75 16/600).

Análise por SDS-PAGE 13% das frações coletadas na cromatografia, realizada na coluna Superdex 75 16/600, e cromatograma correspondente, no qual a linha azul representa a medida de absorvância a 280 nm (mAU). (M: marcador de peso molecular; PC: amostra aplicada na coluna).

Observou-se uma variação da proporção entre as duas populações, a qual foi relacionada à concentração da proteína obtida e ao tempo de manipulação da mesma. Tanto o aumento da concentração quanto do tempo de manipulação, favoreceram o aumento da população supostamente dimérica. Exemplos de cromatogramas gerados na exclusão por tamanho, em que se observa a variação de rendimento entre as populações, são mostrados na figura 11 (A, B e C).

Tendo em vista a presença de dois resíduos de cisteína na sequência, foi investigado se o dímero encontrado poderia ser resultado da formação de ponte

dissulfeto intermolecular, hipótese que foi confirmada com a adição de agente redutor ao tampão e análise das populações por cromatografia de exclusão por tamanho (figura 11D).

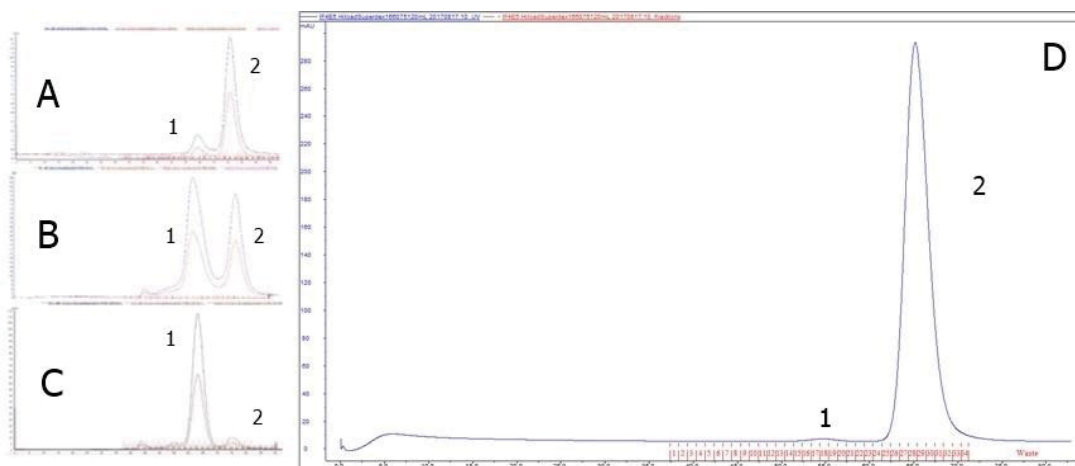


Figura 11 - Cromatografias de exclusão por tamanho da TcEIF4E5 para análise das populações dimérica (pico 1) e monomérica (pico 2).

A, B e C: cromatogramas referentes a exclusões por tamanho realizadas na coluna Superdex 75 16/600, em tampão não redutor, com picos eluídos em 61 mL (1) e 75 mL (2), em que se observa a variação de rendimento entre as populações. **D:** cromatograma referente à exclusão por tamanho realizada na coluna Superdex 75 16/600 em tampão contendo 2 mM de DTT, com picos eluídos em 61 mL (1) e 75 mL (2), em que se observa a estabilização do pico monomérico (pico 2).

A partir desses resultados, adotou-se a adição de 2 mM de DTT ao tampão utilizado na diálise, aos tampões da cromatografia de troca iônica e também ao tampão de cromatografia de exclusão por tamanho. A partir disso, observou-se a estabilização do pico correspondente a um monômero da proteína já na cromatografia de troca iônica, de forma majoritária, e na exclusão por tamanho.

O rendimento final da proteína foi de aproximadamente 2 mg por litro de cultura.

4.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DA TcEIF4G5

A figura 12 mostra o resultado dos testes de expressão das construções da TcEIF4G5 sob condição de indução *overnight* a 18 °C. As três proteínas foram obtidas na fração solúvel, com a construção TcEIF4G5_Ntrunc apresentando menor rendimento.

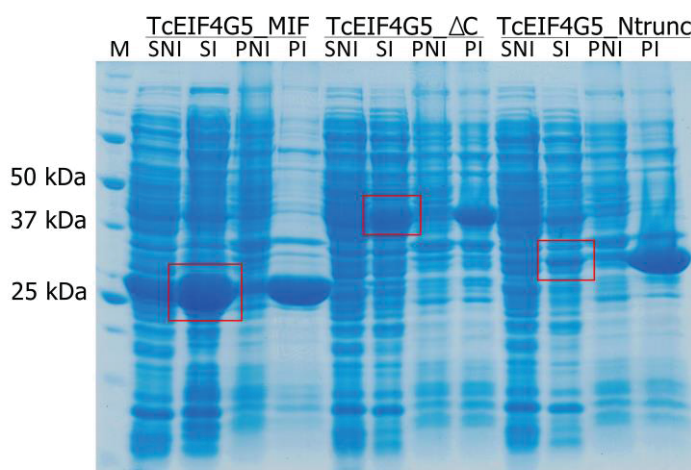


Figura 12 - Análise por SDS-PAGE 13% dos testes de expressão das construções truncadas da TcEIF4G5.

M: marcador de peso molecular; SNI: fração solúvel, controle de expressão não induzida por IPTG; SI: fração solúvel, expressão induzida; PNI: fração insolúvel, controle de expressão não induzida; PI: fração insolúvel, expressão induzida. Os retângulos demarcam as bandas presentes nas frações solúveis correspondentes à massa molecular das proteínas de interesse.

As purificações foram conduzidas utilizando-se volume de cultivo de 1L para a construção TcEIF4G5_MIF e 2L para a construção TcEIF4G5_ΔC, na cepa BL21 (DE3) STAR.

4.5.1 Purificação da TcEIF4G5_MIF

Os resultados de purificação da proteína TcEIF4G5_MIF são mostrados nas figuras 13 e 14. Essa construção da TcEIF4G5 apresentou expressão bastante elevada, o que se refletiu nas frações eluídas já na cromatografia de afinidade (figura 13).

A TcEIF4G5_MIF, bem como as outras construções da proteína TcEIF4G5, apresentou instabilidade em tampão com concentração de NaCl abaixo de 0,2 M. Por conta da necessidade de diminuição de força iônica do tampão para realização da cromatografia de troca iônica, essa etapa de purificação não foi possível, visto que haveria perda da amostra no processo de diálise. Assim, as amostras coletadas na cromatografia de afinidade foram levadas diretamente para a cromatografia de exclusão por tamanho.

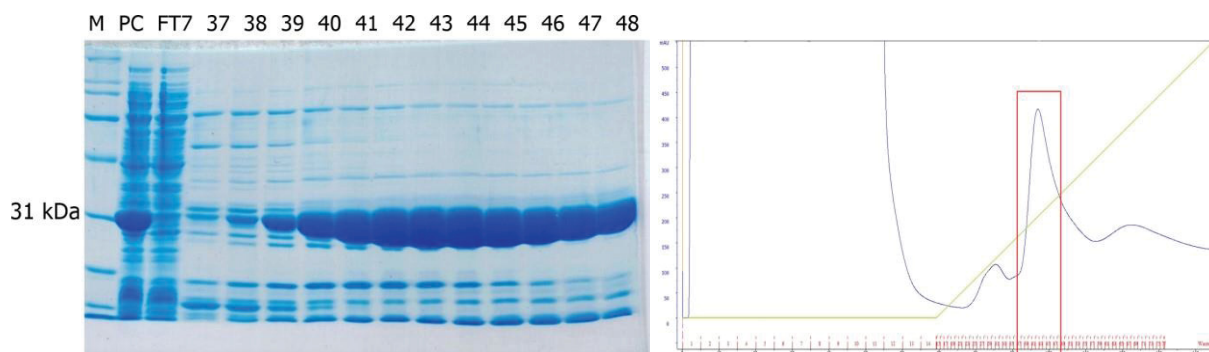


Figura 13 - Resultado da purificação da TcEIF4G5_MIF por cromatografia de afinidade (coluna HisTrap HP 5 mL).

Análise por SDS-PAGE 13% das frações coletadas e cromatograma correspondente, no qual a linha verde representa o gradiente de imidazol da eluição e a linha azul a medida de absorbância a 280 nm (mAU). O retângulo demarca o intervalo de frações aplicadas no gel. (M: marcador de peso molecular; PC: amostra aplicada na coluna; FT: *flowthrough*).

Na cromatografia de exclusão por tamanho da construção MIF houve eluição de um pico majoritário e de alto rendimento em aproximadamente 67 mL (figura 14), observado também no SDS-PAGE. O rendimento final de proteína pura foi de aproximadamente 10 mg por litro de cultura.

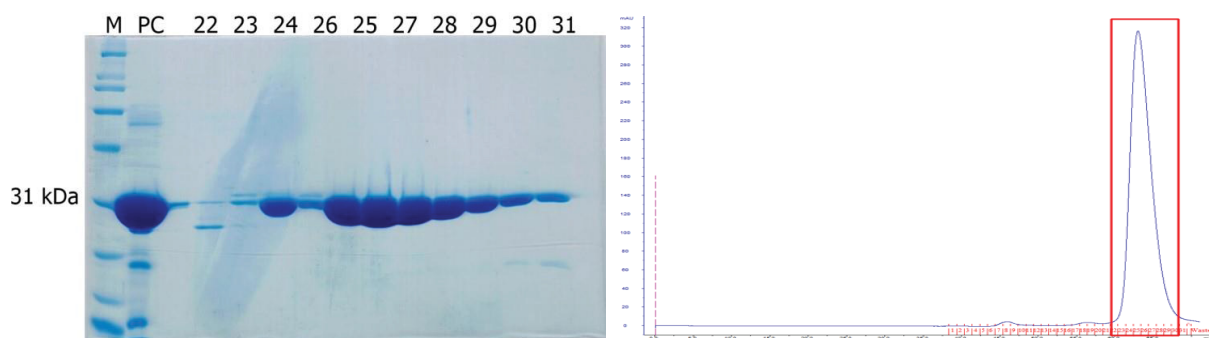


Figura 14 - Resultado da purificação da TcEIF4G5_MIF por cromatografia de exclusão por tamanho (coluna Superdex 75 16/600).

Análise por SDS-PAGE 13% das frações coletadas na cromatografia, realizada na coluna Superdex 75 16/600 e cromatograma correspondente, no qual a linha azul representa a medida de absorbância a 280 nm (mAU). O retângulo demarca o intervalo de frações aplicadas no gel. (M: marcador de peso molecular; PC: amostra aplicada na coluna).

4.5.2 Purificação da TcEIF4G5_ΔC

O primeiro passo de cromatografia utilizado para purificação da TcEIF4G5_ΔC foi também de afinidade. Observou-se que a proteína de interesse foi

eluída na cromatografia de afinidade em dois picos distintos (figura 15), o que foi confirmado através de *Western blot* utilizando anticorpo anti-hexahistidina (dados não mostrados). Assim, ambas as populações foram utilizadas para os ensaios subsequentes.

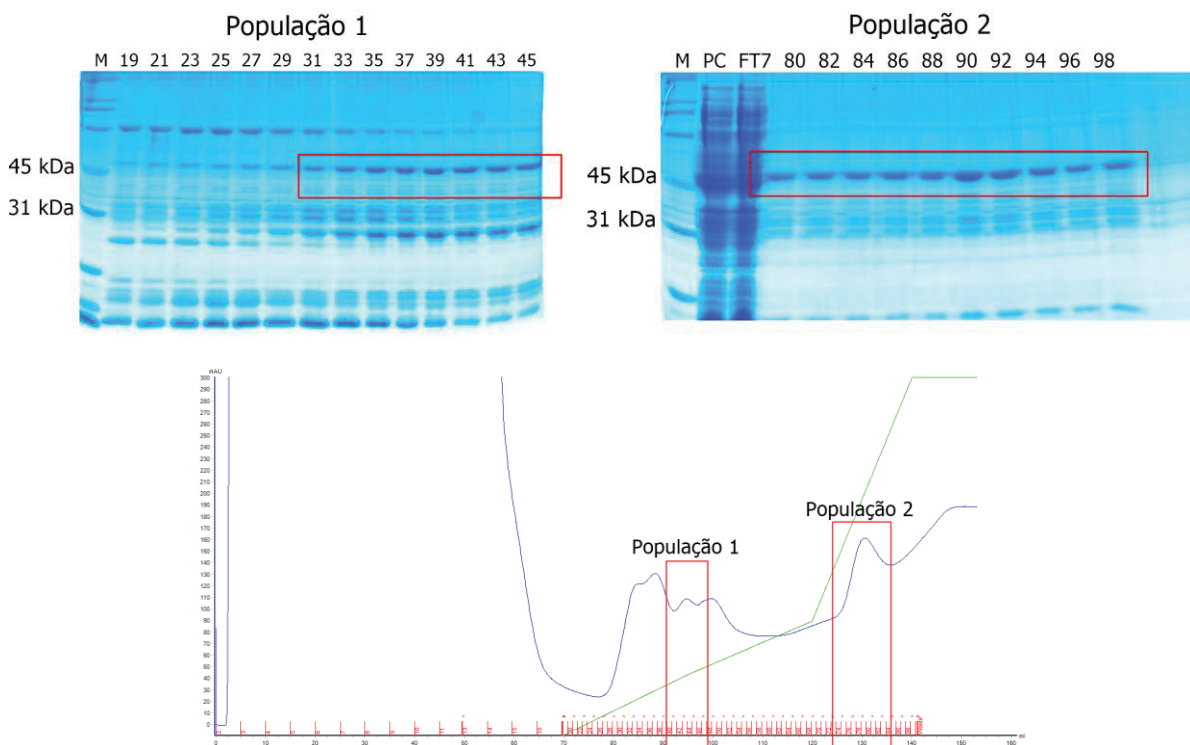


Figura 15 - Resultado da purificação da TcEIF4G5_ΔC por cromatografia de afinidade (coluna HisTrap HP 1 mL).

Análise por SDS-PAGE 13% das frações coletadas e cromatograma correspondente, no qual a linha verde representa o gradiente de imidazol da eluição e a linha azul a medida de absorbância a 280 nm (mAU). Os retângulos demarcam o intervalo de frações aplicadas no gel em que a proteína de interesse está presente. (M: marcador de peso molecular; PC: amostra aplicada na coluna; FT: *flowthrough*).

Como comentado anteriormente, não foi possível realizar-se cromatografia de troca iônica com as construções TcEIF4G5, devido à instabilidade da amostra em tampões de baixa força iônica, sendo assim seguida a purificação através de cromatografia de exclusão por tamanho.

Na cromatografia de exclusão por tamanho, as duas populações da TcEIF4G5_ΔC tiveram perfil de eluição equivalente, com separação parcial de contaminantes, como demonstrado na figura 16. O rendimento da proteína (aproximadamente 0,5 mg de proteína por litro de cultivo) foi mais baixo que das

demais, gerando por fim baixa quantidade de amostra de alta pureza ainda que suficiente para realização dos experimentos de interação com a TcEIF4E5. A proteína demonstrou-se ligeiramente instável durante o tempo de manipulação, observando-se precipitação da amostra quando concentrada a valores acima de 1 mg/mL. Além disso, observa-se no *Western blot* um padrão de degradação da proteína, em que se destaca a presença de uma banda próxima de 25 kDa, marcada pelo anticorpo anti-hexahistidinas, peso próximo ao da construção da TcEIF4G5 contendo somente o domínio MIF. Essa degradação poderia estar relacionada à presença da região N-terminal na TcEIF4G5_ΔC, enquanto o domínio MIF se mantém por ser mais bem estruturado e estável.

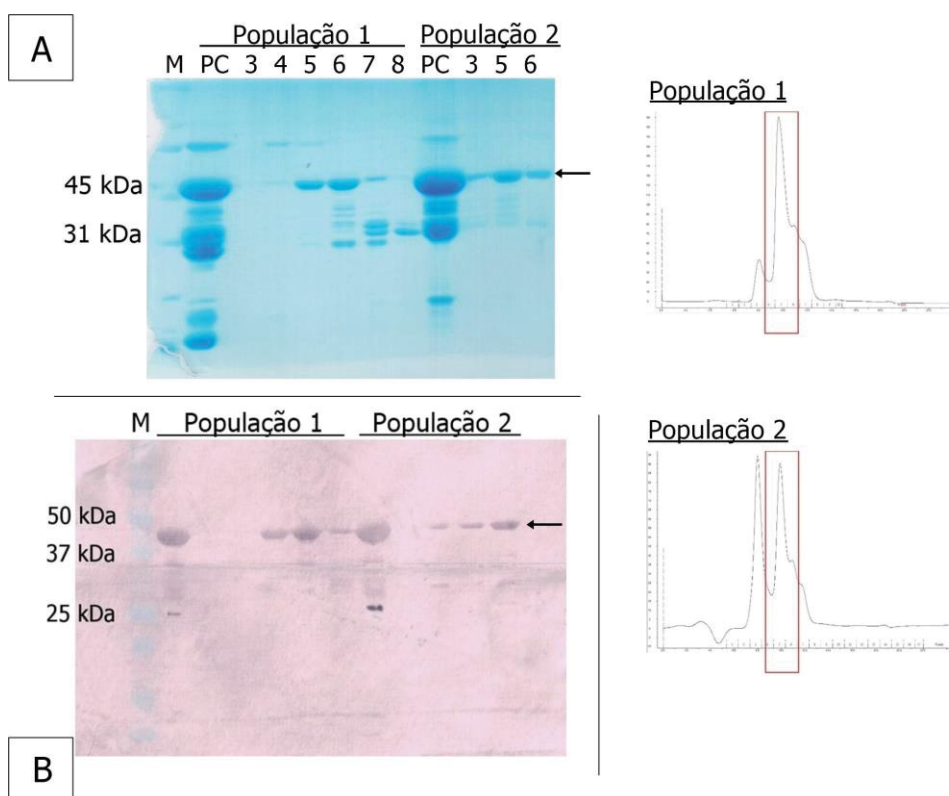


Figura 16 - Resultado da purificação da TcEIF4G5_ΔC por cromatografia de exclusão por tamanho na coluna Superdex 75 10/300.

A: análise por SDS-PAGE 13% das frações coletadas na cromatografia, realizada na coluna Superdex 75 10/300, e cromatograma correspondente, no qual a linha azul representa a medida de absorbância a 280 nm (mAU). (M: marcador de peso molecular; PC: amostra aplicada na coluna). **B:** *western-blot* utilizando o anticorpo anti-hexahistidinas de ambas as populações da TcEIF4G5_ΔC (após a exclusão por tamanho). A banda correspondente à proteína de interesse é indicada com uma seta.

4.6 TESTE DOS SOROS DOS CAMUNDONGOS INOCULADOS COM AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Após a obtenção dos soros pós-ímmes dos camundongos, os mesmos foram testados por *western blot* contra amostras das proteínas TcEIF4E1, TcEIF4E5 e TcEIF4G5_ΔC purificadas, a última sendo utilizada por conter tanto o domínio MIF (TcEIF4G5_MIF), utilizado para as inoculações, quanto a região N-terminal, possibilitando assim a confirmação da presença do domínio MIF na construção ΔC. O resultado do experimento é mostrado na figura 17.

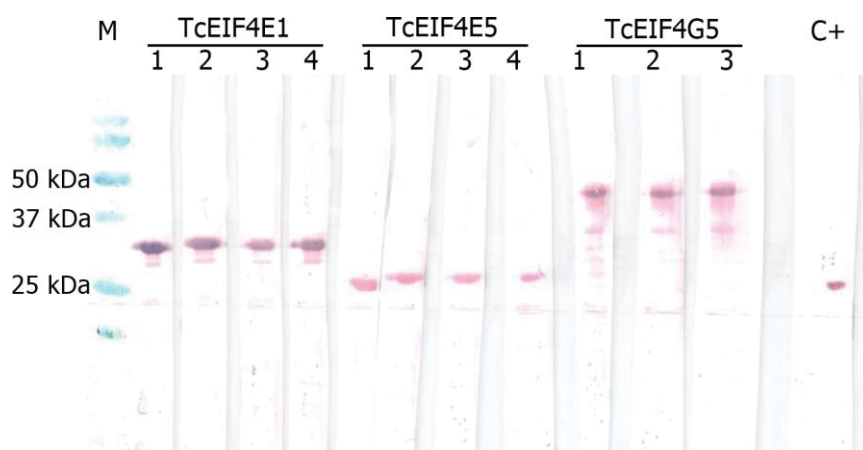


Figura 17 - Teste de reação dos soros imunizados contra as proteínas recombinantes TcEIF4E1, TcEIF4E5 E TcEIF4G5_ΔC.

A numeração diferencia os camundongos inoculados com cada proteína, havendo em cada poço aproximadamente 200 ng de cada proteína purificada. Os soros foram testados em diluição de 1:2000. Controle positivo (C+): anticorpo anti-hexahistidinas marcando a TcEIF4E5 purificada.

A marcação foi eficiente para todos os soros testados. Tais soros foram cedidos à colaboradores do projeto no Laboratório de Regulação da Expressão Gênica (ICC/Fiocruz-PR) para realização de ensaios funcionais *in vivo*.

4.7 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS TcEIF4E POR DICROÍSMO CIRCULAR

Para o prosseguimento dos experimentos de interação e cristalização, as proteínas purificadas tiveram seu enovelamento e estabilidade avaliados através de dicróismo circular. Os espectros de absorção em função do comprimento de onda foram convertidos em elipticidade molar (θ_m). A figura 18 traz os espectros gerados

para as proteínas TcEIF4E1, TcEIF4E2 e TcEIF4E5. O padrão de absorção indica que há estruturação das proteínas, com picos referentes ao conteúdo de hélices α e fitas β , além de regiões desestruturadas.

A TcEIF4E1 apresenta um pico negativo em comprimento de onda abaixo dos 208 nm, o que indica presença de regiões desestruturadas na proteína, concordando com o fato de a mesma possuir uma extensão N-terminal desenovelada além do domínio conservado eIF4E. De forma semelhante à TcEIF4E1, a TcEIF4E2 apresentou sinal condizente com o de uma proteína estruturada. Conhecidamente, a TcEIF4E2 apresenta também uma extensão desestruturada na região N-terminal, a qual é indicada pelo pico negativo pronunciado abaixo dos 208 nm.

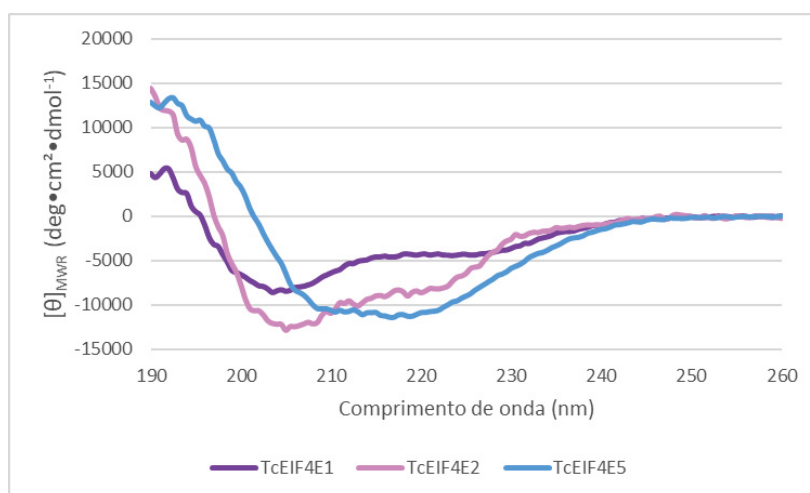


Figura 18 - Espectro de dicroísmo circular obtido das proteínas TcEIF4E1, TcEIF4E2 E TcEIF4E5.

Na TcEIF4E5, a absorção nos comprimentos de onda de 208, 215 e 222 nm, conhecidamente indicadores de estruturação da proteína, mostraram-se praticamente equivalentes, indicando boa estruturação da proteína. Além disso, não houve absorção referente a regiões desestruturadas, como esperado para essa homóloga visto que praticamente toda a sequência da mesma é conservada em relação ao domínio eIF4E, o qual é bem estruturado.

A análise do sinal de CD em função do aumento da temperatura para as três proteínas é mostrada na figura 19.

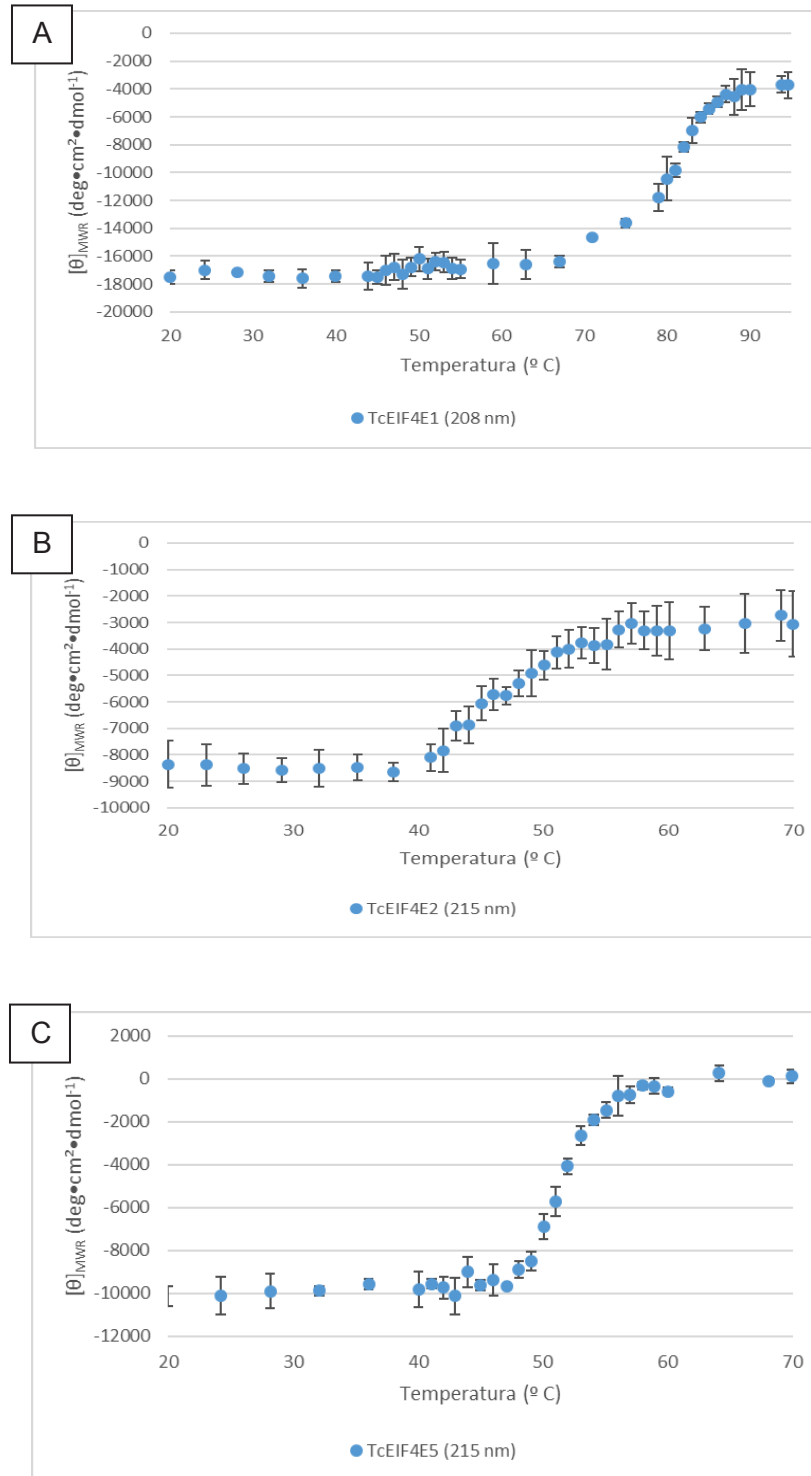


Figura 19 – Resultados do experimento de desnaturação térmica para as proteínas TcEIF4E1, TcEIF4E2 e TcEIF4E5.

O comprimento de onda escolhido para análise dos dados foi de 208 nm para TcEIF4E1 e 215 nm para TcEIF4E2 e TcEIF4E5.

Observa-se para as proteínas TcEIF4E2 e TcEIF4E5, que o ponto de desnaturação para ambas ficou em torno de 50 °C, temperatura de desnaturação

considerada comum à maioria das proteínas. Já para a TcEIF4E1, a curva de desnaturação demonstra a alteração do sinal de CD a partir de 70 °C, com o ponto de desnaturação estando próximo à 80 °C e atingindo a desnaturação e perda de sinal somente próximo à 90 °C, indicando que essa proteína possui maior estabilidade térmica quando comparada às demais.

4.8 ANÁLISE DE INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcEIF4E5 E TcEIF4G5 POR CROMATOGRAPHIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO

Para os ensaios de interação entre as proteínas TcEIF4E5 e TcEIF4G5, as amostras foram aplicadas individualmente na coluna Superdex 75 10/300 para controle dos volumes de eluição (figura 20). Os padrões de eluição foram bem definidos e diferenciados entre as proteínas. O volume de eluição foi de 13 mL para TcEIF4E5, próximo de 12 mL para a construção TcEIF4G5_MIF, e de 10 mL para a construção TcEIF4G5_ΔC.

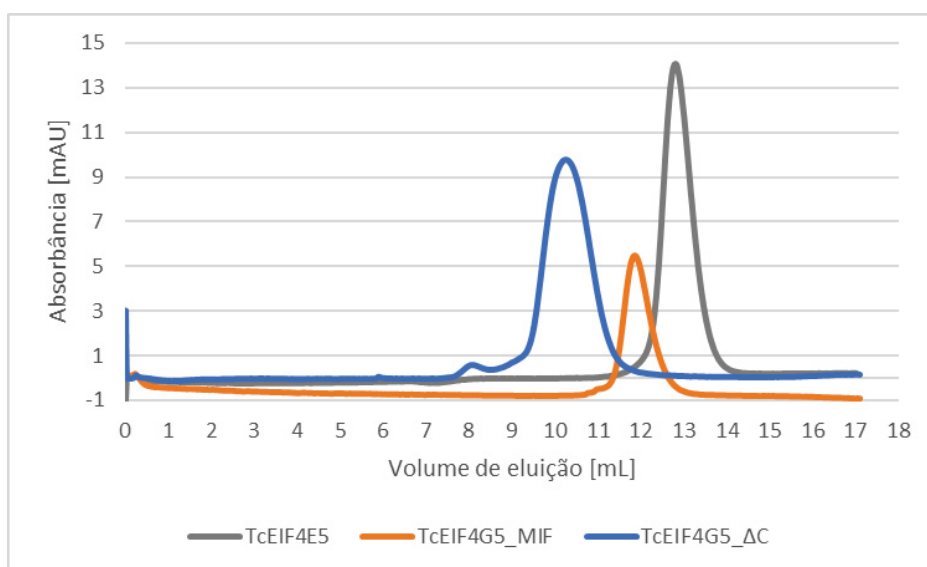


Figura 20 - Padrões de eluição das proteínas TcEIF4E5, TcEIF4G5_MIF e TcEIF4G5_ΔC na coluna Superdex 75 10/300.

Como controle negativo de interação, as proteínas TcEIF4E5 e a construção TcEIF4G5_MIF, a qual não contém a região N-terminal supostamente envolvida na interação, foram submetidas à cromatografia individualmente e em mistura

equimolar. O perfil de eluição, como esperado, não indicou a presença de um pico correspondente a um complexo proteico (figura 21).

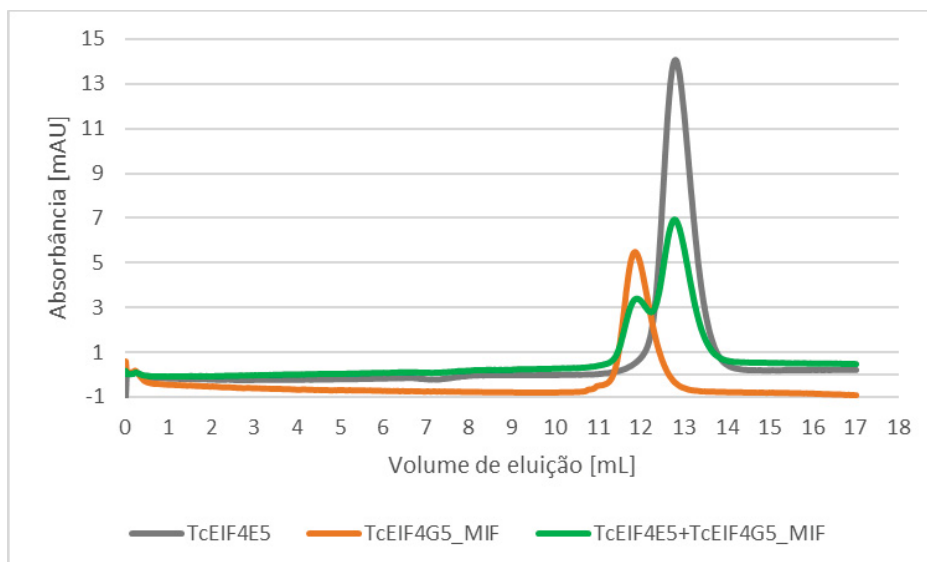


Figura 21 – Análise de interação entre as proteínas TcEIF4E5 e TcEIF4G5_MIF por cromatografia de exclusão por tamanho.

Padrão de eluição obtido na coluna Superdex 75 10/300 para as proteínas aplicadas individualmente e em mistura.

Para a verificação da interação entre as proteínas TcEIF4E5 e TcEIF4G5_ΔC, as proteínas foram também submetidas à cromatografia individualmente e em mistura equimolar, e em um segundo experimento, após diálise conjunta da mistura equimolar contra o tampão da cromatografia (figura 22).

Não foi observada presença de pico correspondente ao complexo (esperado entre 8 e 10 mL), com a eluição dos picos correspondentes às duas proteínas separadamente. Observou-se também que o pico correspondente à TcEIF4G5_ΔC gerou rendimento abaixo do esperado, indicando que a proteína não permaneceu estável. O experimento foi realizado para ambas as populações purificadas da construção TcEIF4G5_ΔC (seção 4.5.2), gerando resultados equivalentes.

Os experimentos foram realizados em duas condições de tampão (50 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl e 2 mM DTT, e 20 mM Fosfato de Sódio pH 7,5, 50 mM NaCl e 2 mM DTT), a segunda condição visando a diminuição da força iônica do tampão. Em ambos os casos, a técnica de exclusão por tamanho não foi capaz de demonstrar a interação entre as proteínas.

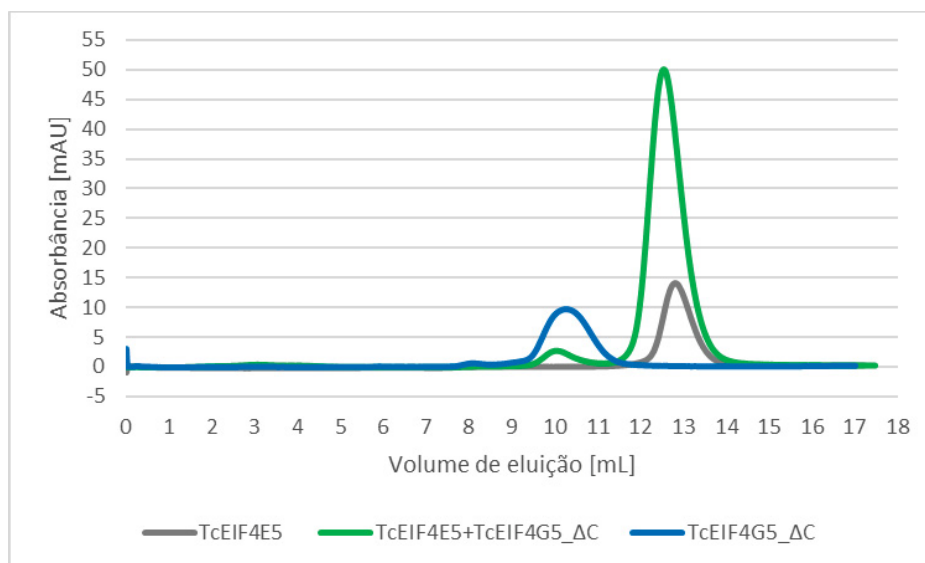


Figura 22 – Análise de interação entre as proteínas TcEIF4E5 e TcEIF4G5_ΔC por cromatografia de exclusão por tamanho.

Padrão de eluição obtido na coluna Superdex 75 10/300 para as proteínas aplicadas individualmente e em mistura.

Tal resultado não significa que as proteínas não interajam, visto que o experimento pode não ter sido realizado em condições favoráveis para a interação. Um dos fatores que pode ter contribuído para o resultado negativo de interação é a possível dissociação do complexo durante o experimento, devido à característica do processo de cromatografia utilizado. Além disso, interações mais fracas podem ter caráter transiente, o que dificulta a identificação de um pico de complexo homogêneo durante a cromatografia.

4.9 ANÁLISE DA INTERAÇÃO TcEIF4E5-TcEIF4G5 POR TERMOFORESE EM MICROESCALA

Para o ensaio de termoforese em microescala entre as proteínas foi realizada a marcação de ambas, visando a realização do experimento com as duas proteínas como alvo e ligante, alternativamente. Entretanto, o comportamento da proteína TcEIF4G5_ΔC após a marcação levou-a a agregação no capilar do experimento, assim inviabilizando as medidas. Dessa forma, o experimento foi conduzido utilizando-se a TcEIF4E5 marcada e titulando-se as construções TcEIF4G5_ΔC e TcEIF4G5_MIF.

A figura 23 traz a sobreposição das curvas de fluorescência normalizada obtidas para a interação entre TcEIF4E5 e as construções TcEIF4G5_ΔC e TcEIF4G5_MIF (controle negativo de interação).

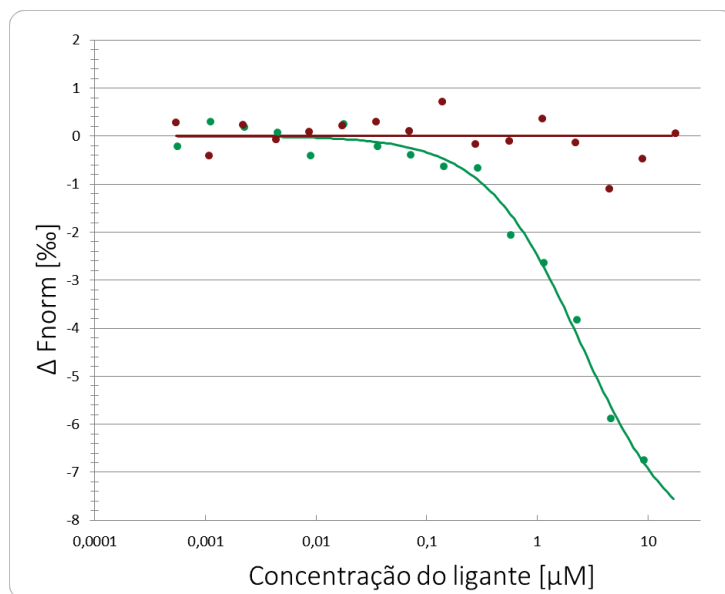


Figura 23 – Análise de interação entre TcEIF4E5 e TcEIF4G5 por termoforese em microescala.

Curva de fluorescência (média da triplicata) normalizada em função da concentração de ligante (16 titulações). Em vermelho escuro, a curva referente à TcEIF4E5 e TcEIF4G5_MIF. Em verde, a curva referente à TcEIF4E5 e TcEIF4G5_ΔC.

Observa-se que não houve variação na fluorescência da TcEIF4E5 quando em presença de concentrações crescentes de TcEIF4G5_MIF, indicando ausência de interação entre as duas proteínas. Dado que a construção TcEIF4G5_MIF não contém a região N-terminal da proteína, onde estaria localizado o sítio de interação, o resultado negativo de interação concorda com os dados encontrados na literatura (SAFAEE et al., 2012).

No ensaio entre TcEIF4E5 e TcEIF4G5_ΔC a variação da fluorescência em função da concentração de ligante indica alteração no padrão de migração termoforética da TcEIF4E5 marcada, e, portanto, interação específica entre as proteínas. Apesar da necessidade de repetição dos ensaios, os resultados obtidos indicam fortemente a existência de uma interação entre TcEIF4E5 e TcEIF4G5, mediada pela região N-terminal da TcEIF4G5. O K_d estimado para a interação foi de $2,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$. Observa-se que a concentração máxima utilizada para a TcEIF4G5_ΔC

não foi suficiente para a saturação da curva, o que compromete o cálculo preciso da constante de dissociação. Entretanto não foi possível a obtenção da proteína em mais alta concentração devido à sua instabilidade e perda da amostra no processo de concentração. Experimentos subsequentes otimizando-se o uso da TcEIF4G5 marcada devem ser realizados a fim de titular a TcEIF4E5, a qual se mostra estável em concentrações elevadas e permitiria a saturação da curva de fluorescência.

4.10 ANÁLISE DE INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcEIF4E E OS ANÁLOGOS DO CAP m^7 GTP E m^7 GTP-A POR TERMOFORESE EM MICROESCALA

4.10.1 TcEIF4E1 e análogos *cap*

A proteína TcEIF4E1 foi submetida à marcação fluorescente da fusão de hexahistidinas, e testada com os análogos do *cap* m^7 GTP e m^7 GTP-A titulados a partir de uma concentração máxima de 400 μ M para ambos. A figura 24 traz as curvas de fluorescência normalizada obtidas para a TcEIF4E1 com os análogos de *cap*.

Para que o cálculo do K_d seja considerado confiável, a curva deve conter duas regiões de fluorescência contante (platôs), referentes às concentrações máximas e mínimas aplicadas com a titulação. Observa-se que o platô referente à concentração máxima de ligante não está completo, sendo indicada a repetição do experimento utilizando-se uma concentração final de ligante mais alta. Tal observação não invalida os dados, que indicam claramente interação entre as moléculas testadas, sendo o K_d calculado de $9,9 \pm 0,4$ μ M para a interação TcEIF4E1- m^7 GTP e $19,4 \pm 1$ μ M para a interação TcEIF4E1- m^7 GTP-A. Com relação aos dados da literatura, a K_d calculada para a interação com o m^7 GTP estaria dentro dos padrões identificados para outras homólogas em tripanossomatídeos, com valores próximos aos da LmEIF4E1 (K_d 6,2 μ M) e TcEIF4E6 (K_d 6,2 μ M) (FREIRE et al., 2014b; YOFFE et al., 2006). Investigações futuras devem incluir o *cap4* de tripanossomatídeos nos experimentos de interação, visando a comparação com os padrões encontrados para proteínas homólogas EIF4E.

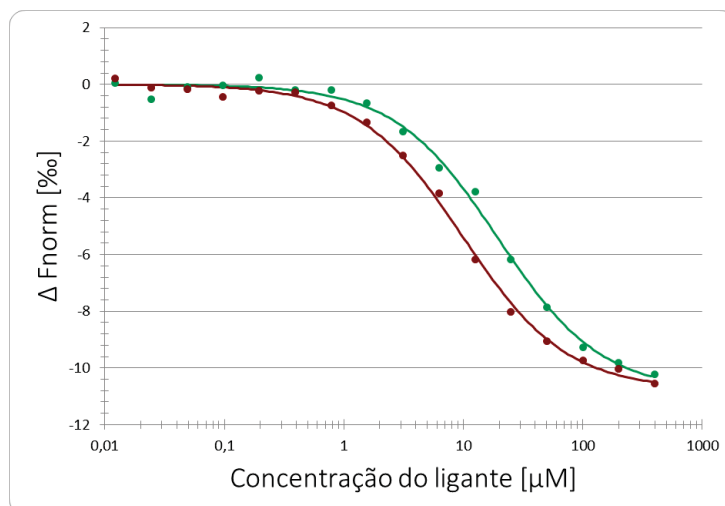


Figura 24 – Análise de interação entre a TcEIF4E1 e os análogos do *cap* do mRNA m⁷GTP e m⁷GTP-A por termoforese em microescala.

Em vermelho, a curva de fluorescência (média da triplicata) normalizada em função da concentração de m⁷GTP, e em verde, a curva de fluorescência (média da triplicata) normalizada em função da concentração de m⁷GTP-A.

4.10.2 TcEIF4E5 e análogos *cap*

A TcEIF4E5 foi marcada (marcação de hexahistidinas) e testada com os análogos de *cap* do mRNA. O análogo m⁷GTP foi utilizado inicialmente em uma concentração de 400 μM para a interação. A figura 25 ilustra curvas de fluorescência bruta para as diferentes concentrações do ligante com as proteínas TcEIF4E1 e TcEIF4E5, comparativamente. Para a TcEIF4E1 (figura 25B), observa-se a alteração na termoforese da proteína de forma clara, indicada pela alteração nas curvas de fluorescência em função da concentração de ligante. Para o caso da TcEIF4E5 (figura 25A), observa-se que não houve alteração de fluorescência e, portanto, não houve diferença na termoforese, indicando que não houve interação entre a proteína e o m⁷GTP.

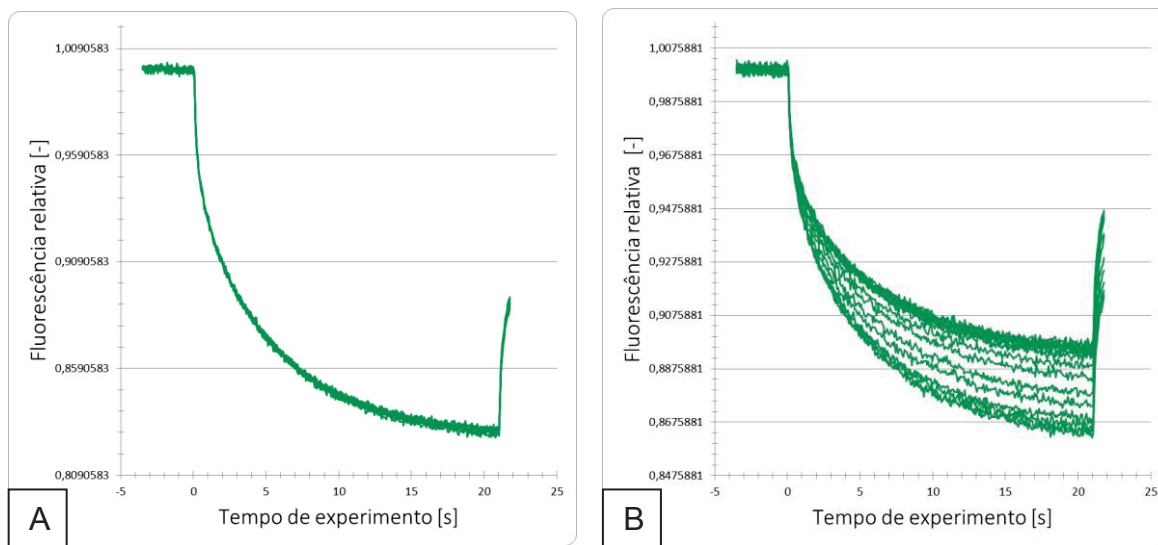


Figura 25 - Curvas de fluorescência bruta obtidas no experimento de termoforese em microescala entre TcEIF4E5 e o m⁷GTP (A) e entre TcEIF4E1 e o m⁷GTP (B).

As diferentes curvas correspondem à diferentes concentrações do ligante. No caso da TcEIF4E5, a sobreposição das curvas indica que não houve alteração da termoforese, portanto, não houve interação com o m⁷GTP.

Diante desse resultado negativo fizemos um segundo experimento em que foram utilizados os análogos do *cap* a mais alta concentração (1 mM). Neste experimento apenas duas condições foram testadas para verificação da interação, com a proteína TcEIF4E5 na ausência e na presença do ligante a alta concentração. Novamente, não foi observada interação entre proteína e ligante. O mesmo teste foi realizado também para o m⁷GTP-A, gerando resultado equivalente (figura 26).

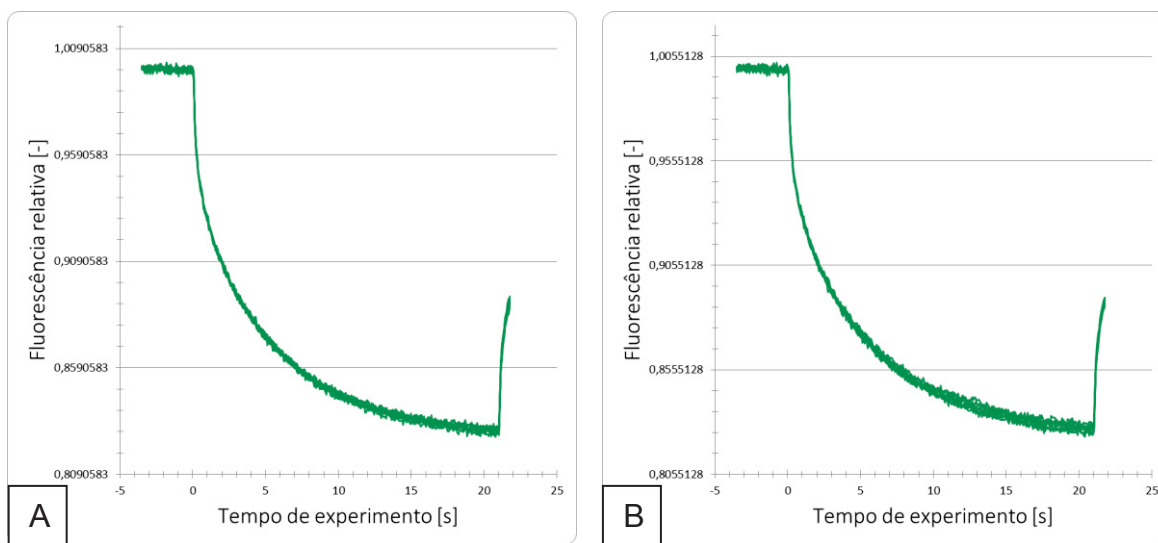


Figura 26 – Curvas de fluorescência bruta obtidas no experimento de termoforese em microescala entre TcEIF4E5 e o m⁷GTP (A) e m⁷GTP-A (B).

Dados da literatura para a homóloga EIF4E5 em *T. brucei* identificaram a interação com o análogo de *cap* m⁷GTP (K_d 1,5 μ M), e também com o *cap4* (K_d 1,8 μ M) (FREIRE et al., 2014a), tornando suprendente a ausência de interação observada em nosso experimento com a TcEIF4E5. Testes com o *cap4* próprio de tripanossomatídeos são necessários, visto que pode ocorrer maior seletividade no caso da TcEIF4E5 quando comparada à homóloga em *T. brucei*. Além disso, também é descrita na literatura maior afinidade das proteínas eIF4E pelo *cap* do mRNA quando ligadas à proteína eIF4G (PRÉVÔT; DARLIX; OHLMANN, 2003), o que sugere que a interação entre TcEIF4E5 e os análogos do *cap* do mRNA possa ocorrer na presença de seu par de interação, a TcEIF4G5.

O indicativo de não interação entre a proteína e ambos os análogos do *cap* torna necessária a repetição dos experimentos a partir de uma outra preparação da proteína, a fim de confirmar o resultado inicial obtido.

4.11 CRISTALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcEIF4E5 E CONSTRUÇÃO

TcEIF4G5_MIF

Os ensaios de cristalização utilizando somente a proteína TcEIF4E5 purificada, sem a presença de ligante, não levaram a condições promissoras para a obtenção de cristais. Por outro lado, a adição à proteína dos análogos *cap* m⁷GTP e m⁷GTP-A, em proporção molar de 0,2 para 0,3 μ M, previamente à cristalização levou à obtenção de cristais da proteína no *kit* INDEX HT, na condição de 0,1 M BIS-TRIS em pH 5,5 e 6,5; 0,2 M Sulfato de Lítio e 25% PEG 3350, sendo posteriormente a condição de cristalização refinada de acordo com os resultados observados. Assim, definiu-se como condição de cristalização a proteína em presença de m⁷GTP, a condição de 0,1 M BIS-TRIS pH 6,0 ou 6,5; 0,2 M Sulfato de Lítio; 25% PEG 3350. Para a proteína incubada com m⁷GTP-A, a condição de cristalização encontrada foi 0,1 M BIS-TRIS pH 6,0 ou 6,5; 0,2 M Sulfato de Lítio; 28% PEG 3350. Fotos dos cristais obtidos são mostradas na figura 27.

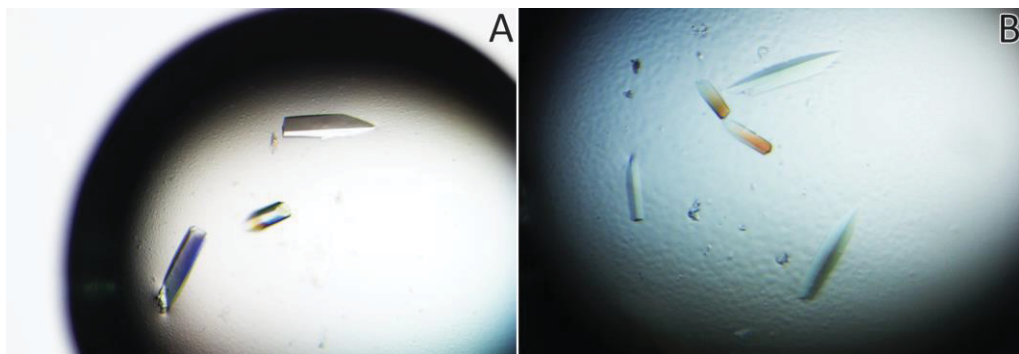


Figura 27 - Cristais de TcEIF4E5 obtidos após incubação com análogo do *cap* m⁷GTP (A) e m⁷GTP-A (B).

A construção da proteína TcEIF4G5 contendo apenas o domínio conservado MIF4G foi a única destas a ser levada a cristalização, visto que as demais contem longas regiões desestruturadas na região N-terminal que muito provavelmente dificultariam a obtenção de cristais. A TcEIF4G5_MIF foi cristalizada na condição de 0,1 M Cacodilato de Sódio pH 6,5 e 2 M Sulfato de Amônio do *kit* comercial JCSG *plus*. Cristais da proteína são mostrados na figura 28.

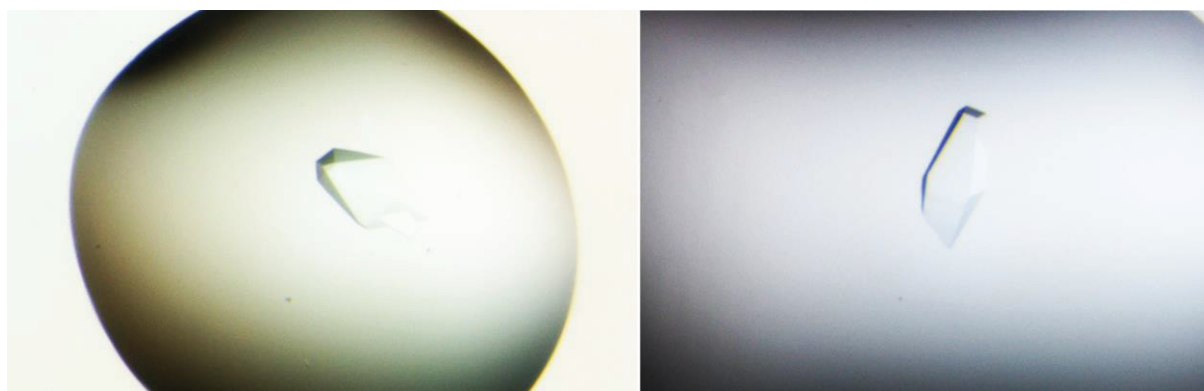


Figura 28 – Cristais de TcEIF4G5_MIF.

Os cristais de TcEIF4E5 e TcEIF4G5_MIF foram submetidos à difração de raios X na linha PROXIMA 1 do Sincrotron SOLEIL (experimentos realizados pela Dr^a. Beatriz Guimarães), tendo como resultado padrões de boa qualidade, com limite de difração até 2,4 Å de resolução. Tentativas iniciais de determinação da estrutura da TcEIF4G5_MIF por substituição molecular não foram bem-sucedidas, sendo necessária a aplicação do método de difração anômala a partir de cristais da proteína marcada com selenometionina. Tentativas de determinação de estrutura da TcEIF4E5 estão em andamento.

4.12 ANÁLISE DOS MODELOS ESTRUTURAIS DAS HOMÓLOGAS TcEIF4E

Os modelos com mais altos valores de *c-score* gerados pela plataforma I-TASSER foram selecionados para o prosseguimento das análises estruturais. Os modelos obtidos para o domínio conservado eIF4E das homólogas de *T. cruzi* foram utilizados para alinhamentos estruturais com homólogas humanas depositadas no PDB. Os dados dos alinhamentos utilizando-se a ferramenta TM-align em relação à estrutura da eIF4E1 humana (PDB:1IPC) são mostrados na tabela 4.

Tabela 4 – Índices de similaridade obtidos pelos alinhamentos estruturais entre os modelos das TcEIF4E e a estrutura cristalográfica da eIF4E1 humana.

O intervalo de resíduos presente nos modelos é indicado entre parênteses.

	TcEIF4E1 (39-261)	TcEIF4E2 (20-250)	TcEIF4E3 (242-447)	TcEIF4E4 (253-410)	TcEIF4E5 (1-200)	TcEIF4E6 (1-186)
TM-score	0,88	0,91	0,92	0,87	0,87	0,82
RMSD (Å)	1.38	1.27	1.25	1.3	1.63	1.9
Número de resíduos alinhados	171	178	179	169	172	165
Identidade (%)	30	33	23	25	18	17

Apesar da baixa identidade de sequência, observa-se uma alta similaridade estrutural das proteínas comparadas e conservação do domínio eIF4E, o que é indicado pelos valores de TM-score acima de 0,8 para todas as proteínas. Entretanto, apesar da conservação do domínio estrutural eIF4E, diferenças locais significativas são observadas entre as homólogas, conforme analisado a seguir.

4.12.1 Análise de inserções

O alinhamento estrutural gerado a partir da ferramenta PROMALS3D das homólogas TcEIF4E e a homóloga humana eIF4E1 mostra a presença, em algumas das homólogas, de longas inserções não conservadas no domínio eIF4E (figura 29).

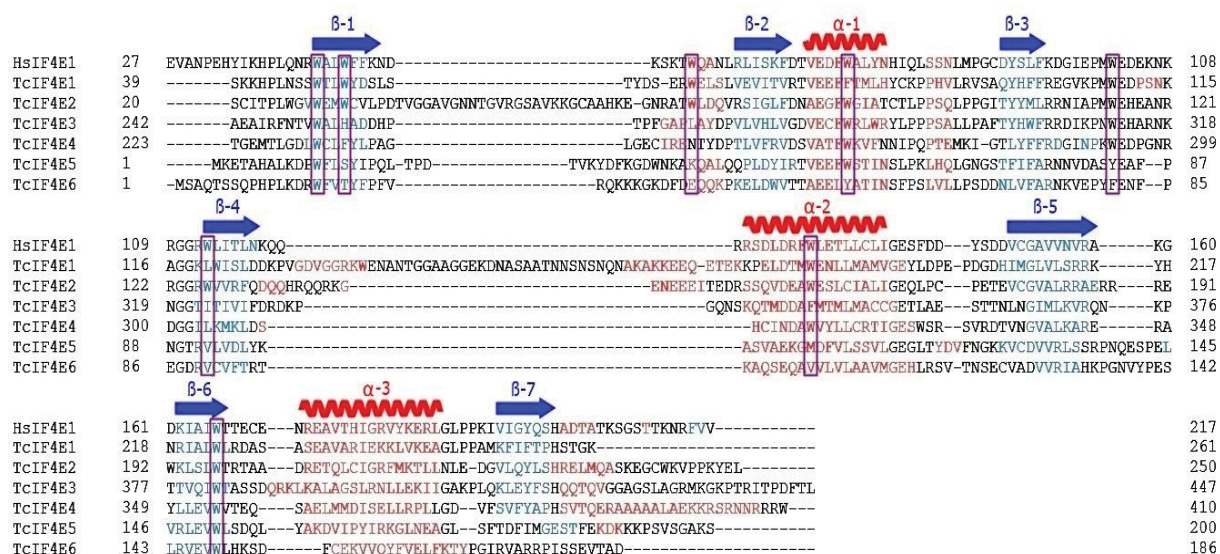


Figura 29 - Alinhamento baseado nas estruturas das homólogas TcEIF4E e a homóloga humana.

Estão demarcados, com base na estrutura da homóloga humana (PDB: 1IPC), os triptofanos conhecidamente conservados na família (retângulos) bem como as estruturas secundárias que compoem o domínio eIF4E. Alinhamento gerado através da ferramenta PROMALS3D.

A TcEIF4E1 apresenta em sua estrutura uma inserção longa (resíduos 131-177) localizada entre a fita β -4 e a hélice α -2. A sequência em si não apresenta características específicas quanto a composição aminoacídica e não está localizada numa região próxima ao sítio de interação com o *cap* do mRNA (figura 30), sugerindo papel estrutural e não relacionado a essa interação. Por outro lado, essa inserção pode estar relacionada a demais interações que a TcEIF4E1 realize na maquinaria de *T. cruzi*.

A TcEIF4E2 apresenta algumas inserções de sequência, sendo a primeira (resíduos 39-65) uma inserção longa em um *loop* localizado próximo ao sítio de interação do *cap*, entre as fitas β -1 e β -2 (figura 30). Pode-se especular que tal inserção tenha um papel na interação com o *cap4*, de estrutura mais complexa, considerando-se especialmente a presença de aminoácidos básicos na sequência (R50, K55, K56, K62). Uma segunda inserção de menor tamanho é encontrada entre a fita β -4 e a hélice α -2 (resíduos 133-151), em região mais distante do local de interação com o *cap* e cuja composição aminoacídica não parece sugerir interação com o mesmo.

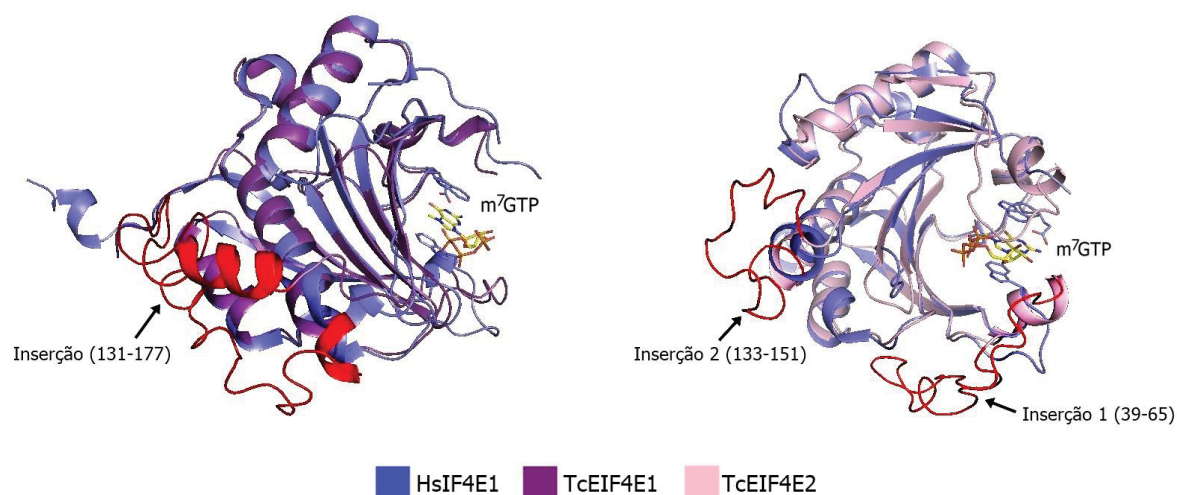


Figura 30 - Sobreposição estrutural entre os modelos TcEIF4E1 e 2 e a eIF4E1 humana.

As cadeias laterais (eIF4E1 humana; PDB: 1IPC) dos resíduos envolvidos no *stacking* do *cap* são mostradas. Regiões em vermelho representam inserções nas sequências.

A homóloga TcEIF4E3 apresenta sua região C-terminal extendida (resíduos 436-447). Quatro resíduos básicos são encontrados na região (R433, K435, R437, R440). A partir da fita β -7 do domínio eIF4E, comumente a região C-terminal é flexível e não estruturada, participando da estabilização da interação com o *cap* no exemplo da eIF4E3 humana (OSBORNE et al., 2013). A presença de resíduos básicos na região C-terminal da TcEIF4E3 sugere que tais resíduos possam participar da estabilização das ligações, especialmente com os grupos fosfato presentes no *cap4*, de maneira semelhante à eIF4E3 humana.

De forma semelhante, a TcEIF4E4 apresenta uma extensão C-terminal (resíduos 401-410), predita pelo PROMALS3D como parte de uma quarta hélice- α , e a mesma apresenta composição que indica participação em interações com os grupos fosfato do *cap*, considerando-se a presença de sete resíduos básicos no fim da sequência (K400, K401, R402, R404, R407, R408, R409). Sobreposições de estrutura entre os modelos das homólogas TcEIF4E3 e TcEIF4E4 e a estrutura da eIF4E1 humana (PDB: 1IPC) são mostradas na figura 31.

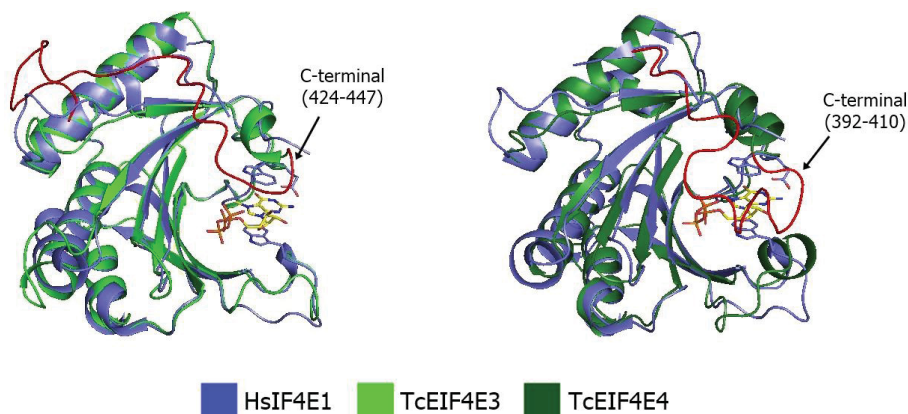


Figura 31 - Sobreposição estrutural entre os modelos TcEIF4E3 e 4 e a eIF4E1 humana.

As cadeias laterais (eIF4E1 humana; PDB: 1IPC) dos resíduos envolvidos no *stacking* do *cap* são mostradas. As regiões C-terminais das sequências são mostradas em vermelho.

A TcEIF4E5 apresenta duas inserções em sua sequência, ambas localizadas na vizinhança da região de interação com o *cap* do mRNA (figura 32). A primeira inserção (resíduos 23-33) apresenta dois resíduos básicos (K26 e K30) e ainda dois resíduos aromáticos (Y27 e W33), estando localizada entre as fitas β -1 e β -2. A presença dessa inserção pode indicar peculiaridades na interação para essa homóloga com relação ao *cap* que envolva a presença de resíduos adicionais. A segunda inserção (resíduos 138-143), entre as fitas β -5 e β -6, também está localizada na região do bolsão de interação ao *cap*. Ainda, destaca-se na TcEIF4E5 a presença de quatro resíduos básicos na região C-terminal, potenciais resíduos de interação com os grupos fosfato do *cap* (K190, K191, K192 e K199).

A TcEIF4E6 apresenta o mesmo padrão de inserções da TcEIF4E5, possuindo duas inserções próximas da região de interação com o *cap* do mRNA, com a primeira inserção contendo potenciais resíduos de interação. A primeira inserção, entre as fitas β 1 e β 2 (resíduos 24-32), contem quatro resíduos básicos que poderiam interagir com os grupos fosfato do *cap* (R27, R28, R29, R31). A segunda inserção (resíduos 135-140) é localizada entre as fitas β -5 e β -6. Sobreposições de estrutura entre os modelos das homólogas TcEIF4E5 e TcEIF4E6 e a estrutura da eIF4E1 humana (PDB: 1IPC) são mostradas na figura 32.

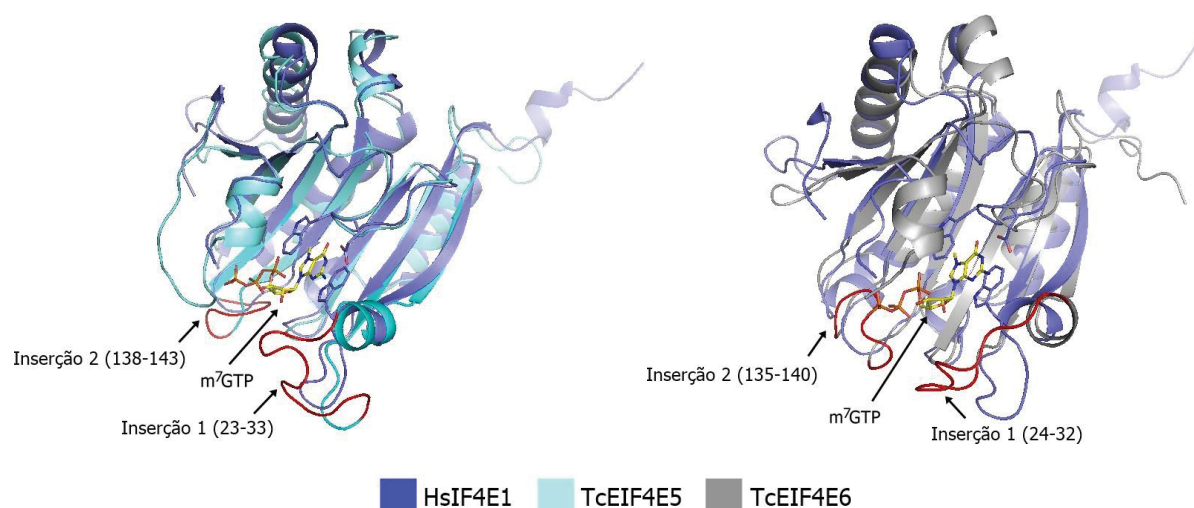


Figura 32 - Sobreposição estrutural entre os modelos TcEIF4E5 e 6 e a eIF4E1 humana.

As cadeias laterais (eIF4E1 humana; PDB: 1IPC) dos resíduos envolvidos no *stacking* do *cap* são mostradas. Regiões em vermelho representam inserções nas sequências.

4.12.2 Análise do sítio de interação com o *cap* do mRNA

A comparação dos resíduos alinhados estruturalmente envolvidos em interações no contexto do *cap* do mRNA entre as homólogas TcEIF4E e a eIF4E1 humana (HsIF4E1) revela substituições em algumas das homólogas que não conservam as propriedades estruturais e polaridade das cadeias laterais (tabela 5 e figura 33).

Tabela 5 - Comparação dos resíduos envolvidos em interações com o *cap* na homóloga humana e nas homólogas TcEIF4E, através de alinhamento estrutural pela ferramenta TM-align.

Substituições não conservativas são demarcadas em laranja.

HsIF4E1	TcEIF4E1	TcEIF4E2	TcEIF4E3	TcEIF4E4	TcEIF4E5	TcEIF4E6
W56	W63	W69	L266	N248/T249	K37	E35
W102	W109	W115	W312	W293	Y83	F81
W166	W233	W197	W382	W354	W151	W148
E103	E110	E116	E313	E294	E84	E82
R112	K119	R125	T322	I303	R91	R89
R157	R214	R185	R372	R345	R137	K134
K162	R219	K193	T378	L350	R147	R144

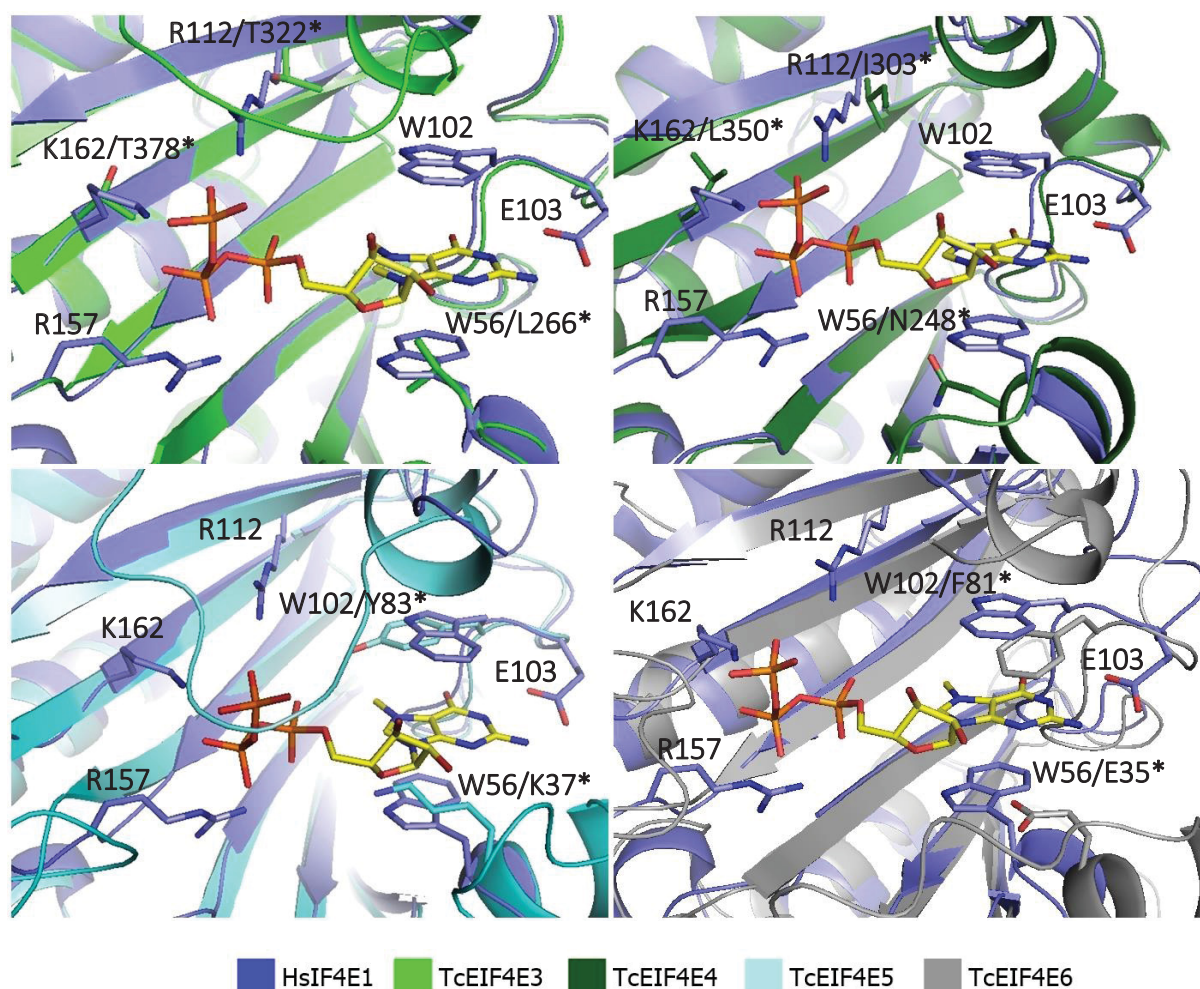


Figura 33 – Análise estrutural da região de interação com o *cap* do mRNA da eIF4E1 humana e das homólogas TcEIF4E.

Resíduos conservados são ilustrados somente na proteína humana (azul escuro; PDB: 1IPC) e resíduos substituintes são identificados nas homólogas TcEIF4E (demarcados com um asterisco). O análogo do *cap* m^7GTP é representado na cor amarela.

Observa-se que as homólogas TcEIF4E1 e TcEIF4E2 conservam todos os resíduos envolvidos na interação com o *cap*.

Já no caso de TcEIF4E3 e TcEIF4E4, um dos aminoácidos aromáticos que formam a interação do tipo *stacking* com a base do m^7GTP é substituído por resíduos não equivalentes, sendo o restante conservado tanto quanto ao segundo resíduo aromático quanto ao resíduo ácido vizinho. Ainda para as homólogas 3 e 4, há substituição de dois dos três resíduos básicos que interagem com os grupos fosfato do *cap*, porém outros resíduos básicos localizados no arcabouço poderiam eventualmente contribuir para as interações, como K370 e K375 para a TcEIF4E3, e K305 e R347 para a TcEIF4E4.

No caso das homólogas TcEIF4E5 e TcEIF4E6 ambos os resíduos aromáticos que participam do *stacking* com a base do *cap* são substituídos, sendo que para um destes resíduos (W56 humano) há substituição não conservativa por resíduos de lisina (TcEIF4E5) e glutamato (TcEIF4E6). O padrão referente à presença de um resíduo aromático seguido de um glutamato se mantém, porém, com a substituição por uma tirosina (TcEIF4E5) e uma fenilalanina (TcEIF4E6).

Com base nessa análise, é possível agrupar as TcEIF4E em 3 grupos distintos. O grupo 1, formado pelas homólogas 1 e 2, apresenta conservação total dos resíduos essenciais para interação com o *cap* do mRNA de acordo com o que já foi descrito para outros eucariotos. O grupo 2, formado pelas homólogas 3 e 4, apresenta conservação parcial do *stacking* da base do *cap* e presença de resíduos básicos em suas extensões C-terminais. O grupo 3, formado pelas homólogas 5 e 6, apresenta inserções próximas à região do arcabouço de interação com os grupos fosfato do *cap*, contendo potenciais resíduos de interação. Tais homólogas também apresentam substituições dos dois resíduos de triptofano que participam da ligação do tipo *stacking* descrita na interação com o *cap*, sendo uma das duas substituições por um resíduo de cadeia lateral aromática. A produção dos modelos estruturais permitiu uma análise mais completa e detalhada de diferenças estruturais locais, que não são identificadas a partir de alinhamentos de sequência. As diferenças identificadas podem ter um efeito sobre a afinidade das homólogas TcEIF4E pelo *cap4*, o que pode estar relacionado a mecanismos de regulação da tradução que tenham impacto sobre o metabolismo do parasita durante seu ciclo de vida.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre as 6 homólogas TcEIF4E, duas delas foram produzidas e purificadas com sucesso. As amostras de proteína obtidas após os processos de purificação foram de alta pureza, podendo ser posteriormente utilizadas nos ensaios de cristalização e interação proteína-proteína e proteína-análogo. Além disso, o correto enovelamento das proteínas foi demonstrado por dicroísmo circular, um importante controle da amostra utilizada. Os resultados de interação entre a homóloga TcEIF4E1 e os análogos de *cap* indica que a proteína interage com o *cap* do mRNA, de forma semelhante à outras homólogas descritas. Além disso, o padrão de afinidade encontrado é coerente com o já descrito na literatura, em que a afinidade pelo m⁷GTP é geralmente mais alta que pelo m⁷GTP-A. No âmbito da interação da TcEIF4E5 com os análogos do *cap*, estudos subsequentes e repetições são necessárias para confirmação do resultado negativo obtido.

No caso da interação TcEIF4E5-TcEIF4G5, foi possível confirmar-se a interação, de forma direta, identificada inicialmente no experimento de duplo-híbrido em levedura realizado por nossos colaboradores. Além disso, foi confirmado que a interação é mediada pela região N-terminal da TcEIF4G5, de forma coerente com o já descrito para essa interação em eucariotos. A interação 4E5-4G5 não havia sido descrita em outro organismo eucarioto ou mesmo em outros tripanossomatídeos, o que representa um alvo proeminente a ser explorado. A obtenção de cristais das proteínas TcEIF4E5 e TcEIF4G5_MIF permitirá a determinação de estruturas cristalográficas. Tais estruturas permitirão a análise detalhada do sítio de interação, contribuindo para um melhor entendimento do processo de iniciação de tradução em *T. cruzi*.

Dentre os objetivos propostos no início do projeto, grande parte foi cumprida. Considero que o projeto cumpriu seu propósito e está no caminho certo para descoberta de características moleculares específicas a *T. cruzi* na iniciação da tradução, visto que os resultados obtidos abrem novas possibilidades de estudo futuro direcionado às características identificadas nas proteínas TcEIF4E.

5.1 PERSPECTIVAS

A partir do trabalho realizado durante esse mestrado, novos experimentos de interação entre as proteínas TcEIF4E e os análogos do *cap* devem ser realizados a fim de determinar diferenças na afinidade das homólogas por diferentes análogos, em especial o *cap4* próprio da classe dos cinetoplastídeos. Tais experimentos podem contribuir para a identificação de interações seletivas no maquinário de iniciação de tradução, bem como relacionar tais interações a fenótipos observados *in vivo*.

Além disso, a identificação de resíduos substituídos na região do sítio de interação e presença de inserções e extensões nas sequências das TcEIF4E indicam diferenças relacionadas às funções realizadas pelas proteínas, o que pode ser futuramente investigado através da produção e purificação das mesmas contendo mutações e deleções.

No que se refere à interação TcEIF4E5-TcEIF4G5, os experimentos seguintes incluem o mapeamento da região N-terminal da TcEIF4G5 para localização do motivo de interação. A partir da identificação desse motivo de interação, peptídeos sintéticos podem ser obtidos para ensaios de co-cristalização com a TcEIF4E5.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, C. E.; LORSCH, J. R. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. **Nature structural & molecular biology**, v. 19, n. 6, p. 568–76, 2012.
- ASLETT, M. et al. TriTrypDB: A functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 457–462, 2009.
- BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BLOCK, H. et al. Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC). A Review. **Methods in Enzymology**, v. 463, p. 439–473, 2009.
- BUCHAN, D. W. A. et al. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Web Server issue, p. 349–357, 2013.
- CALERO, G. et al. letters Structural basis of m7GpppG binding to the nuclear cap-binding protein complex. v. 9, n. 12, p. 912–917, 2002.
- CDC, C. FOR D. C. AND P. **American Trypanosomiasis**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>>. Acesso em: 26 jul. 2016.
- CLAYTON, C. E. Gene expression in Kinetoplastids. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 46–51, 2016.
- CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S4–S5, 2010.
- COSTELLO, J. et al. Global mRNA selection mechanisms for translation initiation. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–21, 2015.
- COURA, J. R. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. **Rev. Soc. Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 113–117, 2006.
- DE BENEDETTI, A.; GRAFF, J. R. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. **Oncogene**, v. 23, n. 18, p. 3189–3199, 2004.
- EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, p. 2126–2132, 2004.
- FORLANI, L. et al. Biological control of the Chagas Disease vector *Triatoma infestans* with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* combined with an aggregation cue: field, laboratory and mathematical modeling assessment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. 1–23, 2015.

FREIRE, E. R. et al. The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties.

Molecular and Biochemical Parasitology, v. 176, n. 1, p. 25–36, 2011.

FREIRE, E. R. et al. eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. **RNA**, v. 20, p. 1272–1286, 2014a.

FREIRE, E. R. et al. *Trypanosoma brucei* translation initiation factor homolog EIF4E6 forms a tripartite cytosolic complex with EIF4G5 and a capping. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 7, p. 896–908, 2014b.

FREIRE, E. R. et al. The role of cytoplasmic mRNA cap-binding protein complexes in *Trypanosoma brucei* and other Trypanosomatids. **Pathogens**, v. 6, n. 55, p. 1–25, 2017.

GINGRAS, A.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. eIF4 Initiation Factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 913–963, 1999.

GRUNER, S. et al. The Structures of eIF4E-eIF4G complexes reveal an extended interface to regulate translation initiation. **Molecular Cell**, v. 64, n. 3, p. 467–479, 2016.

GU, M. et al. Insights into the structure, mechanism, and regulation of scavenger mRNA decapping activity. **Molecular Cell**, v. 14, p. 67–80, 2004.

HINNEBUSCH, A. G. eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, n. 10, p. 553–562, 2006.

HINNEBUSCH, A. G. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 83, n. 1, p. 779–812, 2014.

HONG, P.; KOZA, S.; BOUVIER, E. S. P. Size-Exclusion Chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 35, n. 20, p. 2923–2950, 2012.

JANNIN, J.; VILLA, L. An overview of Chagas disease treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. Supl. I, p. 95–7, 2007.

JOSHI, B.; CAMERON, A.; JAGUS, R. Characterization of mammalian eIF4E-family members. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 11, p. 2189–2203, 2004.

KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 2, p. 125–132, 2010.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119–139, 2005.

KLANN, E.; DEVER, T. E. Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. **Nature reviews**, v. 5, p. 931–942, 2004.

KRAMER, S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 181, n. 2, p. 61–72, 2012.

LI, X. X. et al. The factors during protein crystallization: a review. **Crystallography Reports**, v. 53, n. 7, p. 1261–1266, 2008.

LOPES, A. H. et al. Trypanosomatids: odd organisms, devastating diseases. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, n. 1, p. 30–59, 2010.

MARCOTRIGIANO, J. et al. Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. **Cell**, v. 89, n. 6, p. 951–961, 1997.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. et al. Gene expression in Trypanosomatid parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

MARTINS, E. A. C.; MACIEL FILHO, P. R. Mecanismos de expressão gênica em eucariotos. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 1–5, 2010.

NASCIMENTO, J. DE F. **Caracterização de dois homólogos da proteína de ligação ao cap, EIF4E5 e 6, Trypanosoma brucei e Leishmania major**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger (6ª edição)**. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIEDZWIECKA, A. et al. Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 319, n. 3, p. 615–635, 2002.

OSBORNE, M. J. et al. eIF4E3 acts as a tumor suppressor by utilizing an atypical mode of methyl-7-guanosine cap recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 10, p. 1–6, 2013.

PAPADOPOULOS, E. et al. Structure of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E in complex with 4EGI-1 reveals an allosteric mechanism for dissociating eIF4G. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 31, p. 3187–95, 2014.

PEI, J.; KIM, B. H.; GRISHIN, N. V. PROMALS3D: A tool for multiple protein sequence and structure alignments. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 7, p. 2295–2300, 2008.

PEREIRA, M. M. C. et al. The eIF4E subunits of two distinct trypanosomatid eIF4F complexes are subjected to differential post-translational modifications associated to distinct growth phases in culture. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 190, n. 2, p. 82–86, 2013.

PRÉVÔT, D.; DARLIX, J. L.; OHLMANN, T. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. **Biology of the Cell**, v. 95, n. 3–4, p. 141–156, 2003.

ROSETTANI, P. et al. Structures of the Human eIF4E Homologous Protein, h4EHP, in its m⁷GTP-bound and Unliganded Forms. **Journal of Molecular Biology**, v. 368, p. 691–705, 2007.

SAFAEE, N. et al. Interdomain allostery promotes assembly of Poly(A) mRNA with PABP and eIF4G. **Molecular Cell**, v. 48, p. 375–386, 2012.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: Doença de Chagas aguda no Brasil (2000 a 2013)**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/03/2014-020..pdf>>.

SELKIRK, C. Ion-exchange chromatography. **Methods in Molecular Biology**, v. 244, p. 125–131, 2004.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal of Molecular Biology**, v. 189, n. 1, p. 113–130, 1986.

TAO, Y. et al. RNA Synthesis in a Cage — Structural Studies of Reovirus Polymerase λ 3. **Cell**, v. 111, p. 733–745, 2002.

TOMOO, K. et al. Crystal structures of 7-methylguanosine 5'-triphosphate (m⁷GTP)- and P(1)-7-methylguanosine-P(3)-adenosine-5',5'-triphosphate (m⁷GpppA)-bound human full-length eukaryotic initiation factor 4E: biological importance of the C-terminal flexible region. **The Biochemical journal**, v. 362, n. Pt 3, p. 539–544, 2002.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 472–481, 2001.

VOLPON, L. et al. Cap-free structure of eIF4E suggests a basis for conformational regulation by its ligands. **EMBO Journal**, v. 25, n. 21, p. 5138–5149, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis.** World Health Organization technical report series. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23484340>>.

YOFFE, Y. et al. Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in Leishmania. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 12, p. 1969–1979, 2006.

YOFFE, Y. et al. Evolutionary changes in the Leishmania eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 10, p. 3243–3253, 2009.

ZHANG, Y.; SKOLNICK, J. TM-align : a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 7, p. 2302–2309, 2005.

ZINOVIEV, A.; SHAPIRA, M. Evolutionary conservation and diversification of the translation initiation apparatus in trypanosomatids. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

ZORIO, D. A. R.; BENTLEY, D. L. The link between mRNA processing and transcription: Communication works both ways. **Experimental Cell Research**, v. 296, n. 1, p. 91–97, 2004.